

N° d'ordre: 2230

# THESE

Présentée par

**Huy Phong DAO**

Pour obtenir le titre de :

**DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE  
DE TOULOUSE**

**École Doctorale:**

**Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingenieries**

**Spécialité: Microbiologie**

CARACTERISATION DE CERTAINS GENES POLYCETONES SYNTHASES  
CHEZ *ASPERGILLUS OCHRACEUS* NRRL 3174  
PRODUCTEUR D'OCHRATOXINE A ET D'ACIDE PENICILLIQUE

**Soutenue le 01 juillet 2005, devant le jury composé de:**

<b>M. J. P. ROUSTAN (Pr. ENSAT-INPT)</b>	<b>Président</b>
<b>M. A. LEBRIHI (Pr. ENSAT-INPT)</b>	<b>Directeur de thèse</b>
<b>M. J. L. GOERGEN (Pr. ENSAIA-INPL)</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>M. J. L. PERNODET (D.R. U. ORSAY Paris XI)</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Mme. F. MATHIEU (M. C. F. ENSAT-INPT)</b>	<b>Examineur</b>
<b>M. N. SABAOU (Pr. ENS-Kouba)</b>	<b>Examineur</b>

*Je dédie affectueusement cette thèse,*

*A mes parents.*

*A ma femme.*

*A mes frères et sœurs.*

*A ma famille.*

*A tous mes amis.*

## ***Avant-propos***

*Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Génie Chimique (UMR 5503, CNRS-INPT-UPS) au sein du Département « Bioprocédés et Systèmes Microbiens » à l'École Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse (ENSAT-INPT) sous la direction scientifique de Monsieur le Professeur Ahmed LEBRIHI et la codirection de Madame Florence MATHIEU Maître de Conférences. Je souhaite leur adresser mes remerciements pour m'avoir accueilli dans l'équipe, pour leur direction scientifique, leur dévouement, leur gentillesse et persévérance durant ce travail.*

*Je souhaite exprimer également mes remerciements à Monsieur Alan DOBSON, Doctor au Département de Microbiologie, University College Cork, en Irlande qui m'a accueilli dans son laboratoire pour un stage sur la technique de rupture de gène chez le champignon *A. ochraceus*.*

*Ma reconnaissance s'adresse également à Monsieur le Professeur Laurent GENTZBITTEL, Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des Plantes, ENSAT-INPT, qui m'a permis de réaliser la construction de la banque d'ADNc au sein de son équipe et sous sa direction.*

*J'adresse mes remerciements à Messieurs les Professeurs Jean-Luc PERNODET et Jean-Louis GOERGEN qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail.*

*Enfin, je tiens à remercier les gens des différents laboratoires où je suis passé pendant la durée de la thèse, qui m'ont accompagné pour l'ambiance amicale qu'ils ont su créer durant ces dernières années et pour leur aide et leurs encouragements:*

*Olivier, Hend, Abdelghani, Hadjira, Murielle, Awanwee, Gamal, Nouredine, Ali, Cécilia, Cécile, Montsy et John.*

## Abréviations

ACP:	Acyl Carrier Protein
ADHP:	acide dihydropenicillique
ADN :	acide désoxyribonucléique
ADNc :	acide désoxyribonucléique complémentaire
AP :	acide pénicillique
ARN :	acide ribonucléique
AT:	Acyl transferase
A <sub>w</sub> :	activité de l'eau
CoA :	coenzyme-A
DH :	Dehydratase
ER :	Enoyl reductase
Etc :	et cetera
FAS :	acide gras synthase
FAS :	Fatty Acid Synthase
Fig. :	figure
HPLC :	chromatographie liquide à haute performance
KR :	Ketoreductase
KS :	Ketosynthase
MSA :	acide 6-methysalicyclique
MSAS :	acide 6-methysalicyclique synthase
MT :	Methyltransferase
OTA :	ochratoxine A
PCR :	polymerase chain reaction
PKS :	polycétone synthase
Q-PCR :	PCR quantitative
RACE-PCR :	Rapid amplification of cDNA ends PCR
TE :	Thioesterase
UV:	Ultraviolet
NADH :	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Hydride
PSED :	Peptide synthase elongation domain
ATP :	Adénosine triphosphate
pb :	paire de base

# Sommaire

Avant-propos

Abréviations

INTRODUCTION GENERALE.....	page 1
CHAPITRE I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
I. Généralités sur les moisissures et les mycotoxines dans les denrées alimentaires.....	3
I.1. Moisissures et leur double rôle.....	3
I.2. Mycotoxines et toxinogénèse.....	4
I.2.1. Facteurs influençant la toxinogénèse.....	5
I.2.1.1. Facteurs intrinsèques.....	5
I.2.1.2. Facteurs extrinsèques.....	7
a. Disponibilité en eau.....	7
b. Température.....	7
c. Composition gazeuse.....	8
d. Nature du substrat du milieu.....	8
I.2.1.3. Facteurs divers.....	9
I.2.3. Toxicité des mycotoxines.....	9
II. <i>Aspergillus ochraceus</i> et ses métabolites secondaires.....	11
II.1. <i>Aspergillus ochraceus</i> .....	11
II.2. Métabolites secondaires d' <i>A. ochraceus</i> .....	12
II.2.1 Ochratoxine A.....	14
II.2.2. Acide pénicillique.....	15
II.2.3. Melleine et Hydroxymelleine.....	16
II.2.4. D'autres métabolites secondaires.....	17
III. Polycétones fongiques.....	18
IV. Polycétones synthèses.....	22
IV.1. Structure d'une PKS.....	22
IV.2. Différents types de PKS.....	25
IV.3. Fonction des PKS fongiques.....	27
IV.3.1. Acide 6-methylsalicylique synthase (MSAS) chez <i>P. patulum</i> .....	28

IV.3.2. PKS de la compactine chez <i>P. citrinum</i> .....	30
IV.4. Organisation des gènes de la voie de biosynthèse d'un polycétone.....	32
IV.4.1. Organisation des gènes en cluster.....	32
IV.4.1. Voie de biosynthèse des aflatoxines chez <i>A. flavus</i> .....	32
IV.5. Régulation de la biosynthèse des polycétones.....	35
IV.5.1. Source de carbone.....	35
IV.5.2. Source d'azote.....	36
IV.5.3. Source de phosphate.....	37
IV.5.4. pH.....	38
 CHAPITRE II. DIVERSITE DES PKS CHEZ <i>A. OCHRACEUS</i> NRRL 3174.....	39
Introduction.....	39
Résultats.....	41
1. Amplification et analyses phylogénétiques des domaines KS.....	41
2. Production des polycétones chez <i>A. ochraceus</i> NRRL 3174.....	43
3. Expression des gènes <i>pks</i> .....	45
Discussion.....	46
 <u>Article 1:</u>	
Amplification and analysis of ketosynthase domains of putative polyketide synthase genes in <i>Aspergillus ochraceus</i> NRRL 3174.....	49
Abstract.....	49
1. Introduction.....	50
2. Materials and methods.....	51
2.1. Fungal culture conditions.....	51
2.2. Extraction of penicillic acid and HPLC analysis.....	52
2.3. Nucleic acids extraction.....	52
2.4. RT-PCR reaction.....	53
2.5. Data analysis.....	53
3. Results and Discussion.....	54
3.1. Amplification of ketosynthase domains.....	54
3.2. Clustering of putative PKSs identified.....	56
Conclusion.....	58
References.....	59

# CHAPITRE III. CARACTERISATION D'UNE PKS INTERVENANT DANS LA BIOSYNTHESE DES TETRA ET PENTACETONES CHEZ *A. OCHRACEUS* NRRL 3174

Introduction.....	67
Résultats et Discussion.....	68
1. Allongement des séquences AoKS1, AoKS9, AoKS11, AoLC35-6 et AoLC35-12.....	68
2. Séquençage du gène <i>aomsas</i> .....	72
3. Obtention du mutant <i>A. ochraceus</i> MINCUN109 par rupture de gène <i>aomsas</i> .....	74
<u>Article 2 :</u>	
Characterization of a polyketide synthase gene involved in the biosynthesis of penicillic acid in <i>Aspergillus ochraceus</i> NRRL 3174.....	80
Abstract.....	81
Introduction.....	81
Materials and methods.....	82
Fungal strains and culture conditions.....	82
Extraction of secondary metabolites.....	83
High-performance liquid-chromatography (HPLC) analysis.....	84
Nucleic acids extraction.....	84
RT-PCR reaction.....	84
Mutant construction.....	85
Screening of transformants.....	86
Data analysis.....	86
Sequence accession number.....	86
Results.....	86
1. Cloning of polyketide synthase gene in <i>A. ochraceus</i> NRRL 3174 by using “gene-walking” strategy.....	86
2. PA production and <i>aomsas</i> gene expression.....	87
3. Disruption of <i>aomsas</i> gene in <i>A. ochraceus</i> .....	88
Discussion.....	88

References.....	91
CHAPITRE IV. DEVELOPPEMENT D'AMORCES SPECIFIQUES POUR LA	
DETECTION RAPIDE DES CHAMPIGNONS PRODUCTEURS D'OTA	
ET DE CITRININE.....	99
Introduction.....	99
Résultats et Discussion.....	101
1. Détection du producteur de citrinine, <i>P. citrinum</i> .....	101
2. Détection du producteur d'OTA, <i>A. carbonarius</i> .....	102
3. Détection du producteur d'OTA, <i>P. verrucosum</i> .....	103
<u>Article 3:</u>	
Two primer pairs to detect OTA producers by PCR method.....	106
Abstract.....	106
Introduction.....	107
Materials and methods.....	108
1. Fungal strains and culture conditions.....	108
2. Genomic DNA extraction.....	108
3. PCR reaction.....	109
4. Data analysis.....	109
Results.....	109
1. Primer selection.....	109
2. PCR reactions.....	110
Discussion.....	110
References.....	113
DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALES.....	121
PERSPECTIVES.....	124
1. Comprendre le rôle précis du gène <i>aomsas</i> chez	
<i>A. ochraceus</i> NRRL 3174.....	124
2. Etudier la voie de biosynthèse d'AP et d'OTA.....	124
3. Déterminer le rôle d'autres PKS identifiées chez	
<i>A. ochraceus</i> NRRL 3174.....	125
4. Optimisation des systèmes de détection rapide des champignons	
toxigènes.....	125
REFERENCES.....	126



# Introduction générale

D'après la FAO (Food and Agriculture Organization), environ 25% des récoltes mondiales de produits alimentaires sont contaminés par des mycotoxines (Mannon et Johnson, 1985). Ce sont des métabolites secondaires toxiques (ochratoxine A, aflatoxines, fumonisines, patuline, etc.) produits par de nombreux champignons microscopiques (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, etc.) sur une large variété de denrées alimentaires avant, pendant et après récolte. Les mycotoxines provoquent de graves problèmes pour la santé humaine et animale en raison de leur toxicité (effets hépatotoxiques, immunotoxiques, tératogènes et cancérogènes, etc.) et induisent aussi des pertes économiques importantes du fait de la non consommation des produits contaminés. Rien qu'en Europe, même si le pourcentage de céréales contaminées par l'ochratoxine A atteint la limite visée de 3%, cela représente approximativement 6 millions de tonnes et une potentielle perte économique évaluée entre 800 et 1000 millions d'euros (Olsen *et al.*, 2003). Rien qu'aux Etats-Unis, les pertes de récoltes dues à la présence d'aflatoxines, de fumonisines et de désoxynivalénoles sont estimées à 932 millions de dollars. Ce chiffre est largement dépassé si l'on inclut les dégâts causés par d'autres mycotoxines.

Afin de limiter le risque mycotoxique dans les produits alimentaires, plusieurs pays ont établi des normes fixant la quantité maximale de mycotoxine tolérée dans chaque produit. Cela va dans le sens des consommateurs qui sont de plus en plus exigeants vis à vis d'une meilleure qualité sanitaire pour tous les produits qu'ils consomment. Il est donc très important pour les industriels du domaine agroalimentaire de développer des stratégies efficaces pour limiter l'occurrence des mycotoxines dans leurs produits. Il s'agit d'une part de limiter la contamination des produits par les moisissures à tous les stades de la chaîne de production (culture au champ, récolte, stockage, transformation....) et d'autre part de détecter le plus précocement possible les mycotoxines dans les matières premières avant que ces dernières ne soient transformées en produit final. Actuellement, les méthodes couramment utilisées permettent de quantifier directement la mycotoxines. Ces techniques restent relativement onéreuses et ne permettent donc pas la mise en œuvre de plan d'échantillonnage contenant plusieurs centaines voire milliers d'échantillons à analyser. En plus, quand la mycotoxine est détectée, il est trop tard car il n'existe pas de procédés fiables permettant de retirer la

mycotoxine sans dénaturer le produit. Une stratégie de prévention de la contamination par les mycotoxines est donc exigée. Pour cela, il est indispensable de comprendre la voie de biosynthèse de ces mycotoxines ainsi que les facteurs qui influencent leur production et de mettre au point des techniques spécifiques, rapides et peu onéreuses pour quantifier rapidement les champignons toxinogènes. Parmi environ 300 mycotoxines identifiées, une vingtaine de familles a été considérée importante (Bridge *et al.*, 1998). Pour la plupart, ce sont des métabolites de nature polycétone pour lesquels la polycétone synthase (PKS) est l'enzyme clé de la voie de biosynthèse. Jusqu'à maintenant seule la voie de biosynthèse d'aflatoxines a été établie.

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons choisi *Aspergillus ochraceus* comme modèle d'étude. Ce champignon est capable de produire plusieurs polycétones importants comme l'ochratoxine A ou l'acide pénicillique et de plus, c'est un contaminant fréquent de nombreuses denrées alimentaires.

Ce travail de thèse est présenté en trois parties comme suit :

La première porte sur la diversité des gènes de polycétones synthases (PKS) chez *A. ochraceus* NRRL 3174. L'étude a été menée en utilisant la technique de PCR avec des amorces dégénérées et en se basant sur des techniques phylogénétiques pour l'exploitation des résultats de PCR. L'expression des gènes PKS identifiés a été étudiée conjointement avec la production de certains polycétones produits par ce champignon.

La deuxième partie s'est orientée sur la détermination du rôle de certaines PKS dans la biosynthèse des polycétones importants comme l'ochratoxine A ou l'acide pénicillique.

Dans la troisième partie, nous avons développé des amorces spécifiques, grâce à des séquences d'ADN préalablement déterminées, pour mettre au point la détection rapide des champignons producteurs d'ochratoxine A et de citrinine par méthode de PCR.

Les résultats de thèse sont présentés sous forme de publications. Des résultats complémentaires sont également apportés et discutés dans chaque chapitre.

# **CHAPITRE I**

## **REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

# **I. Généralités sur les moisissures et les mycotoxines dans les denrées alimentaires**

## **I.1. Moisissures et leur double rôle**

Les moisissures sont des champignons microscopiques qui ont des actions bénéfiques mais aussi néfastes pour l'homme. Ce sont des eucaryotes, hétérotrophes, donc obligés de puiser dans le milieu de développement les substances nutritives nécessaires à leur métabolisme. On peut les trouver partout, dans le sol et dans l'air, sur les vêtements, les plantes, les aliments. Ces derniers sont généralement des milieux très favorables à leur développement. Plusieurs moisissures, notamment les genres *Acremonium*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Stachybotrys*, *Trichoderma*, sont connues pour être des contaminants des produits agricoles et/ou pour leur capacité à produire des métabolites toxiques (Cahagnier *et al.*, 1998).

L'appareil végétatif des champignons est un thalle composé de filaments (hyphes) ramifiés dont l'ensemble constitue le mycélium. Ils se reproduisent grâce à des spores. Celles-ci sont issues soit d'une reproduction sexuée (champignon téléomorphe) ou d'une multiplication asexuée (champignon anamorphe). Certains champignons, chez qui les deux formes coexistent sont appelés holomorphes. Différents groupes de moisissures ont été définis suivant leur mode de reproduction sexuée et les caractéristiques de leur spore. Les Zygomycètes possèdent des spores contenues à l'extérieur d'une cellule renflée, les Ascomycètes ont des spores regroupées dans des sortes de sacs, les Basidiomycètes qui ont des spores portées par des basides, et les Hyphomycètes. Ces derniers sont un groupe hétérogène dont on ne connaît pas actuellement, pour la plupart, la forme de reproduction sexuée (Kiffer et Morelet, 1997 ; Cahagnier *et al.*, 1998). Les moisissures se rencontrent dans tous les groupes en particulier dans les Hyphomycètes mais sont assez peu nombreuses chez les Basidiomycètes. Dans le cas d'une reproduction asexuée, il y a formation, à partir d'un hyphe spécialisé nommé conidiophore, de spores mitotiques qui sont des excroissances appelées conidies.

Les moisissures sont ubiquitaires et présentent des avantages économiques intéressants pour l'homme. Dans les milieux naturels, elles contribuent, avec d'autres

microorganismes, à la biodégradation et au recyclage des matières organiques comme la litière ou le bois. Certaines sont utilisées dans l'alimentation, comme *Penicillium roquefortii* et *P. camembertii* pour la production de fromages, d'autres sont exploitées pour la production d'enzymes (40% des enzymes produits industriellement), d'acides organiques (acide citrique et gluconique par des espèces d'*Aspergillus* et *Penicillium*), de médicaments (production de pénicilline par *P. chrysogenum*, de céphalosporine par *Cephalosporium acremonium*) (Carlile et Watkinson, 1997 ; Kiffer et Morelet, 1997 ; Perry *et al*, 2004). Environ 22% des antibiotiques identifiés sont produits par les champignons filamenteux (Berdy, 1995 ; Strohl, 1997). Il est à noter que la production de biomasse de *P. chrysogenum* sert aussi d'engrais ou d'aliment pour le bétail (Kiffer et Morelet, 1997).

A côté des effets très bénéfiques et positifs des champignons dans la vie courante, ils sont capables de provoquer également d'importants dégâts, notamment dans le domaine agronomique. La contamination fongique des denrées alimentaires, destinées à l'homme ou à l'animal, est le principal dommage qui va entraîner de nombreux problèmes. Ainsi, la présence indésirable des moisissures modifie l'aspect des produits alimentaires, dû notamment à la production de pigments, comme par exemple un pigment foncé, la mélanine (Bulter et Day, 1998). Le développement de ces champignons sur les aliments peut leur donner des odeurs de moisi. Il y a donc une réduction quantitative et qualitative de la valeur alimentaire de la denrée, et une baisse du rendement des récoltes. Les métabolites produits par ces champignons lors de leur croissance sont aussi des éléments majeurs dans l'altération des denrées alimentaires. Des manifestations dans la qualité organoleptique (en modifiant le goût de la denrée par exemple) mais aussi de graves problèmes sanitaires surgissent, comme par exemple des risques d'intoxication due à la présence de mycotoxines. Ainsi, l'apparition de mycoses et d'allergies chez l'homme peut résulter de l'ingestion des denrées contaminées par des moisissures. Dans certains pays de l'Est de l'Europe, il a été démontré que la néphropathie endémique des Balkans (cancer du rein et des voies urinaires) est liée à la consommation de céréales contaminées par l'ochratoxine A (Krogh, 1987).

## **I.2. Mycotoxines et toxinogénèse**

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires, de faible poids moléculaire, présentes dans plusieurs produits de l'alimentation humaine et animale et qui

provoquent de nombreuses maladies chez l'homme et l'animal (Mayer, 1953; Coker, 1997). Plusieurs milliers de molécules toxiques ont été identifiées chez les champignons mais seule une vingtaine de familles posent des problèmes en nutrition humaine ou animale (Cahagnier *et al.*, 1998).

Les mycotoxines représentent actuellement une grande préoccupation pour les industries alimentaires. Lorsqu'elles sont produites dans les matières alimentaires, leur décontamination est très difficile. Ces molécules ne sont pas détruites au cours d'un stockage prolongé et sont souvent résistantes aux traitements thermiques ou chimiques (Langseth *et al.*, 1993 ; Cahagnier *et al.*, 1998).

La contamination des moisissures sur les aliments ne signifie pas obligatoirement la présence de mycotoxines. La production des mycotoxines peut s'effectuer depuis le champ jusqu'à l'assiette. Cependant, le type de mycotoxines contaminant les aliments ainsi que la quantité de mycotoxine produite dépendent de plusieurs éléments comme les espèces fongiques (facteur intrinsèque), les conditions écologiques (facteurs extrinsèques) dans lesquelles les champignons se développent (Tableau 1). Il dépend également de la stabilité de ces toxines dans le milieu alimentaire.

### **I.2.1. Facteurs influençant la toxinogénèse**

#### **I.2.1.1. Facteurs intrinsèques**

Les mycotoxines sont essentiellement élaborées par des espèces appartenant aux genres *Aspergillus*, *Fusarium* et *Penicillium*. Certaines mycotoxines peuvent être produites par plusieurs espèces appartenant à des genres différents. Par exemple l'ochratoxine A (OTA) est produite par *Penicillium nordicum*, *P. verrucosum* (Olsen *et al.*, 2003), *Aspergillus ochraceus* (Van der Merwe *et al.*, 1965) et *A. carbonarius*. De même, une espèce peut élaborer plusieurs mycotoxines. Par exemple l'acide pénicillique et l'OTA sont produits par *A. ochraceus*. Cependant certaines mycotoxines sont étroitement liées à certaines espèces fongiques : aflatoxines (*A. flavus* et *A. parasiticus*), sporidesmines (*Pithomyces chartarum*) (Fitzgerald *et al.*, 1998). Au sein d'une même espèce réputée toxinogène, toutes les souches n'ont cependant pas cette propriété.

**Tableau 1** : Mycotoxines produites par quelques champignons (d'après Ciegler et Kurtzman, 1970 ; Le Bars et Le bars, 1987 ; Comerio *et al.*, 1998)

Mycotoxine	Condition favorable	Moisissure	Denrée
Aflatoxines B1, B2, G1 et G2	Climats tropicaux et subtropicaux	<i>Aspergillus parasiticus</i> , <i>A. flavus</i>	Arachide, maïs, sorgho
Ochratoxines A, B, C	Climats frais et tempérés	<i>A. ochraceus</i> , <i>A. carbonarius</i> <i>P. verrucosum</i> , <i>P. nordicum</i>	Maïs, orge, blé, café Raisin, vin
Zéaralénone	Moisissures ubiquistes	<i>Fusarium roseum</i> , <i>Fusarium</i> sp.	Maïs, blé, sorgho
Vomitoxine, Nivalenol, Fusarenone Toxine T2, Diacetoxyscirpenol	Moisissures ubiquistes	<i>F. tricinctum</i> , <i>Fusarium</i> sp.	Maïs, orge, blé, avoine
Fumonisin	Climats tempérés et climats chauds	<i>F. moniliforme</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>Fusarium</i> sp.	Maïs, orge, blé, avoine
Citrinine	Climats tempérés	<i>P. citrinum</i> , <i>Monascus ruber</i>	Fruits, riz, maïs
Patuline	Traumatisme, défaut d'aérobiose	<i>P. patulum</i> , <i>Byssosclamyces nivea</i>	Pomme, maïs
Acide penicillique	Climats frais	<i>A. ochraceus</i> , <i>P. cyclopium</i> , <i>P. puberulum</i>	Maïs
Moniliformine	Moisissures ubiquistes	<i>F. proliferatum</i> , <i>F. subglutinans</i>	Maïs
Acide cyclopiasonique	Souvent en association à aflatoxines	<i>A. flavus</i>	Maïs

### **I.2.1.2. Facteurs extrinsèques**

#### **a) Disponibilité en eau ( $A_w$ )**

La disponibilité en eau a une influence déterminante sur le développement du champignon ainsi que sur sa production de mycotoxines, notamment dans les denrées peu hydratées comme les céréales, les grains de café (Cahagnier *et al.*, 1998). Dans ce cas, la toxinogénèse semble proportionnelle à l'activité en eau. La plupart des moisissures préfèrent une  $A_w$  entre 0,85 et 0,99 pour leur développement. L' $A_w$  minimale permettant le développement de la plupart des champignons contaminant les céréales est de 0,7. Certaines moisissures xérophiles (*A. flavus* ou *P. restrictis*) peuvent se développer dans les fruits secs, le lait en poudre, les confitures, charcuteries sèche dont l' $A_w$  est moindre (Le Bars et Le Bars, 1987 ; Bourgeois *et al.*, 1996). Généralement, les espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium* sont des contaminants typiques des céréales au stockage tandis que les espèces de *Fusarium* préfèrent le milieu dont l' $A_w$  est plus élevée (Pardo *et al.*, 2004).

#### **b) Température**

Les moisissures peuvent se développer entre 0 et 35°C. Certaines espèces sont capables de se développer à des températures extrêmes : *Cladosporium herbarum* peut se développer à des températures inférieures à 0°C et *A. flavus* ou *fumigatus* jusqu'à 60°C (Bourgeois *et al.*, 1996). En général, la température optimale de toxinogénèse est voisine de la température optimale de croissance. Pour d'autres toxines, telles que la zéaralénone élaborée par *F. roseum*, la température optimale de toxinogénèse est généralement inférieure à celle de la croissance, respectivement 15 et 25°C environ. Parfois, l'apparition de mycotoxine dans les conditions naturelles est favorisée par des températures relativement basses, au voisinage de la température minimale de croissance : de l'ordre de 1 à 4°C pour les trichothécènes produites par *F. tricinctum*.



### **c) Composition gazeuse**

La plupart des moisissures sont aérobies. La réduction de la pression partielle en oxygène et surtout l'accroissement de la teneur en CO<sub>2</sub> ont un effet dépresseur important sur la toxinogénèse. La production d'aflatoxines chez l'arachide, modérément réduite entre 21 et 5% d'O<sub>2</sub>, est pratiquement inhibée que lorsque la proportion en O<sub>2</sub> est inférieure à 1 %. L'augmentation de la teneur en CO<sub>2</sub> (20 %), surtout si elle est associée à une réduction en oxygène, provoque une chute importante de la production d'aflatoxines. Dans une atmosphère confinée, telle qu'elle se présente dans un ensilage mal tassé, *F. roseum* peut encore élaborer de la zéaralénone. *B. nivea* est anaérobie et produit de la patuline même en anaérobiose (Le Bars et Le Bars, 1987). Après conservation dans une atmosphère confinée, dans laquelle les moisissures peuvent plus ou moins se développer, la remise à l'air libre ou la ventilation provoque rapidement une intense toxinogénèse.

### **d) Nature du substrat du milieu**

La toxinogénèse dépend beaucoup plus étroitement que la croissance de la composition chimique de la denrée sur laquelle les moisissures se développent. Sur une denrée alimentaire, on trouve souvent une espèce dominante donc ses toxines. Par exemple, *P. verrucosum* est le producteur principal d'OTA dans les céréales tandis que *P. nordicum* contamine souvent les produits riches en protéine, des produits fermentés à la base de viande, fromages (Lund et Frisvard, 2003). Ainsi, les céréales sont, toutes conditions égales par ailleurs, beaucoup plus propices à la toxinogénèse que le soja, le colza et les protéines d'origines animales (saucisson, jambon). Ainsi, *Stachybotris atra* et ses toxines (trichothécènes macrocycliques) ne se retrouvent pratiquement que dans les pailles récoltées humides ou réhydratées. En effet, d'une part, cette espèce est très cellulolytique et hydrophile ; d'autre part, dans les denrées plus riches en nutriments, elle est très rapidement devancée par de nombreuses autres espèces qui ont des exigences en eau inférieures et une vitesse de croissance supérieure. Néanmoins, en culture pure *in vitro*, la production des trichothécènes est bien plus importante dans les céréales que dans la paille.

### **I.2.1.3. Facteurs divers**

Les insectes et acariens sont des vecteurs de spores de moisissures qu'ils introduisent à l'intérieur même du grain par les lésions qu'ils créent. La contamination d'arachide, de coton, de maïs par *A. flavus* ou les aflatoxines avant la récolte est souvent liée à l'attaque par les insectes. Dans le stockage, les échantillons de grain hébergeant des charançons révèlent en général une population fongique importante et parfois des mycotoxines (aflatoxine B1, ochratoxine A, citrinine dans le maïs ou l'orge).

La présence de plusieurs espèces fongiques sur la même denrée a généralement un effet dépressif sur la production de toxine. Cela s'explique d'une part, par la compétition pour le substrat et d'autre part, par le fait que certaines souches peuvent dégrader la toxine.

### **I.3. Toxicité des mycotoxines**

Le contact avec les mycotoxines peut être à l'origine de toxicités chroniques et aiguës allant de la mort à des effets délétères sur le système nerveux central, l'appareil cardiovasculaire et l'appareil respiratoire, ainsi que sur l'appareil digestif chez l'homme ou l'animal. Le risque carcinogène est beaucoup étudié, mais les mycotoxines peuvent avoir de nombreux autres effets : tératogènes, immunotoxiques, hémorragiques, œstrogéniques, hépatotoxiques ou neurotoxiques (Tableau 2).

**Tableau 2** : Effets probables des principales mycotoxines sur l'homme

Aflatoxine	Cancérogène : Cancer du foie et des voies biliaires, cancer broncho-pulmonaire et bronchique (B1) Mutagène : Anomalie de la synthèse des enzymes de réparation de l'ADN (B1)
Ochratoxine A	Cancérogène : Cancer du rein Mutagène : Anomalie de la synthèse des enzymes de réparation de l'ADN Immunosuppresseur Néphrotoxique : Néphropathie endémique (Balkans), néphropathie interstitielle chronique (Maghreb)
Patuline	Immunosuppresseur : Diminution du nombre de lymphocytes du sang (lymphopénie) si intoxication chronique Neurotoxique : Troubles nerveux (action antiacétylcholinestérase)
Fumonisines	Cancérogène : Association avec des cancers de l'œsophage, notamment chez les femmes (Afrique du Sud), et du foie (Chine)
Trichotécènes	Mutagène : Anomalie de la synthèse des enzymes de réparation de l'ADN (Toxine T2) Immunodépresseur : Altération de la phagocytose, inhibition de la synthèse protéique (Toxine T2 et Désoxynivalénole) Respiratoire : Pneumopathie interstitielle desquamative Aleucie (Union Soviétique, Europe Centrale, Etats-Unis, Finlande, Chine)
Zéaralénone	Oestrogénique : Puberté précoce et gynécomastie (Porto-Rico)
Trémorgène	Respiratoires : Alvéolites allergiques
Citréoviridine	Neurotoxique : Paralysie des extrémités, convulsion, mort par arrêt respiratoire
Acide aspergillique	Respiratoires : Alvéolites allergiques
Fusarine C	Mutagène : Anomalie de la synthèse des enzymes de réparation de l'ADN
Gliotoxine	Immunosuppresseur : Mortalité des lymphocytes
Fusarochromanone	Malformations osseuses chez les adolescents (Chine)

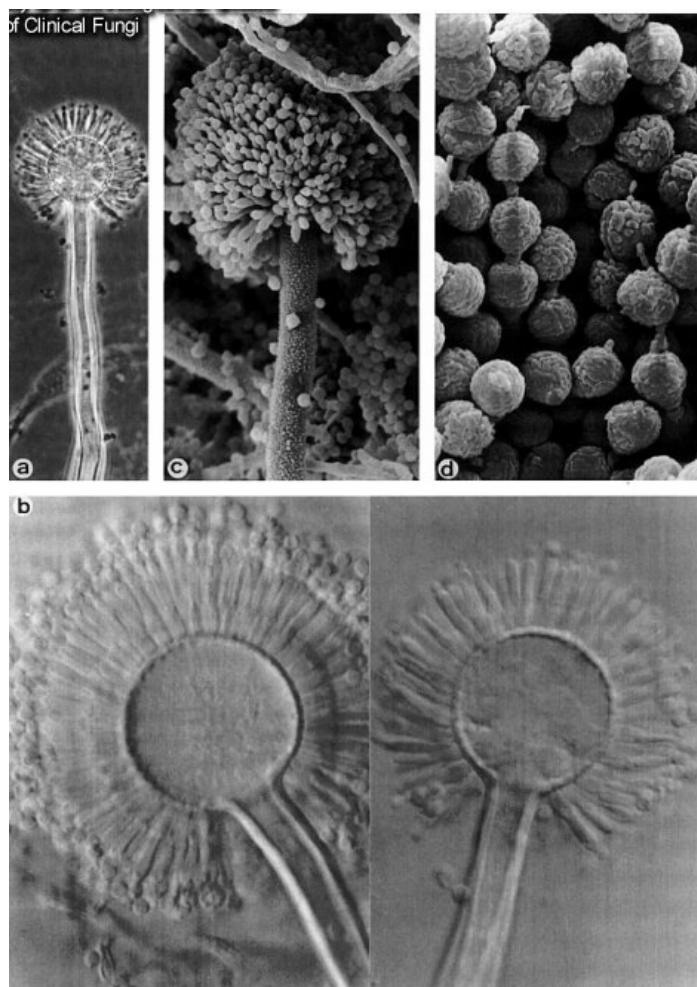
(d'après Certin et Tuite, 1966; [http://biosol.free.fr/liens/myco\\_2004.htm](http://biosol.free.fr/liens/myco_2004.htm))

## II. *Aspergillus ochraceus* et ses métabolites secondaires

### II.1. *Aspergillus ochraceus*

*Aspergillus ochraceus* (Wilhelm, 1887) fait partie des *Deuteromycetes* (champignons imparfaits, reproduction asexuelle), ordre des *Hyphomycetes*, famille des *Moniliaceae* qui sont des champignons à conidiophores libres et dont tous les éléments fongiques sont transparents ou de couleur claire.

Sur une boîte de Pétri contenant le milieu MA (Malt Agar), la colonie est granuleuse, ocre à chamois clair. Le revers de la boîte de Petri est dans les mêmes tons, parfois brun (Cahagnier *et al.*, 1998). Sur le milieu CYA (Czapek Yeast extract Agar), le diamètre de la colonie est de 40 à 52 mm après 7 jours d'incubation à 25°C. Le stipe est de 400 à 1000 µm, de couleur hyaline jusqu'à légèrement brune. Les vésicules sont globuleuses, de diamètre de 20 à 35 µm. La tête de sporifère d'*A. ochraceus* est globuleuse et dissociée en mèches (Fig. 1).



**Fig. 1.** *A. ochraceus* K. Wilh (Raper *et al.*, 1965)

a : Colonie 7 jours à 25°C sur le milieu CYA ; b : La tête de conidie ;  
c-d : Conidiophores.

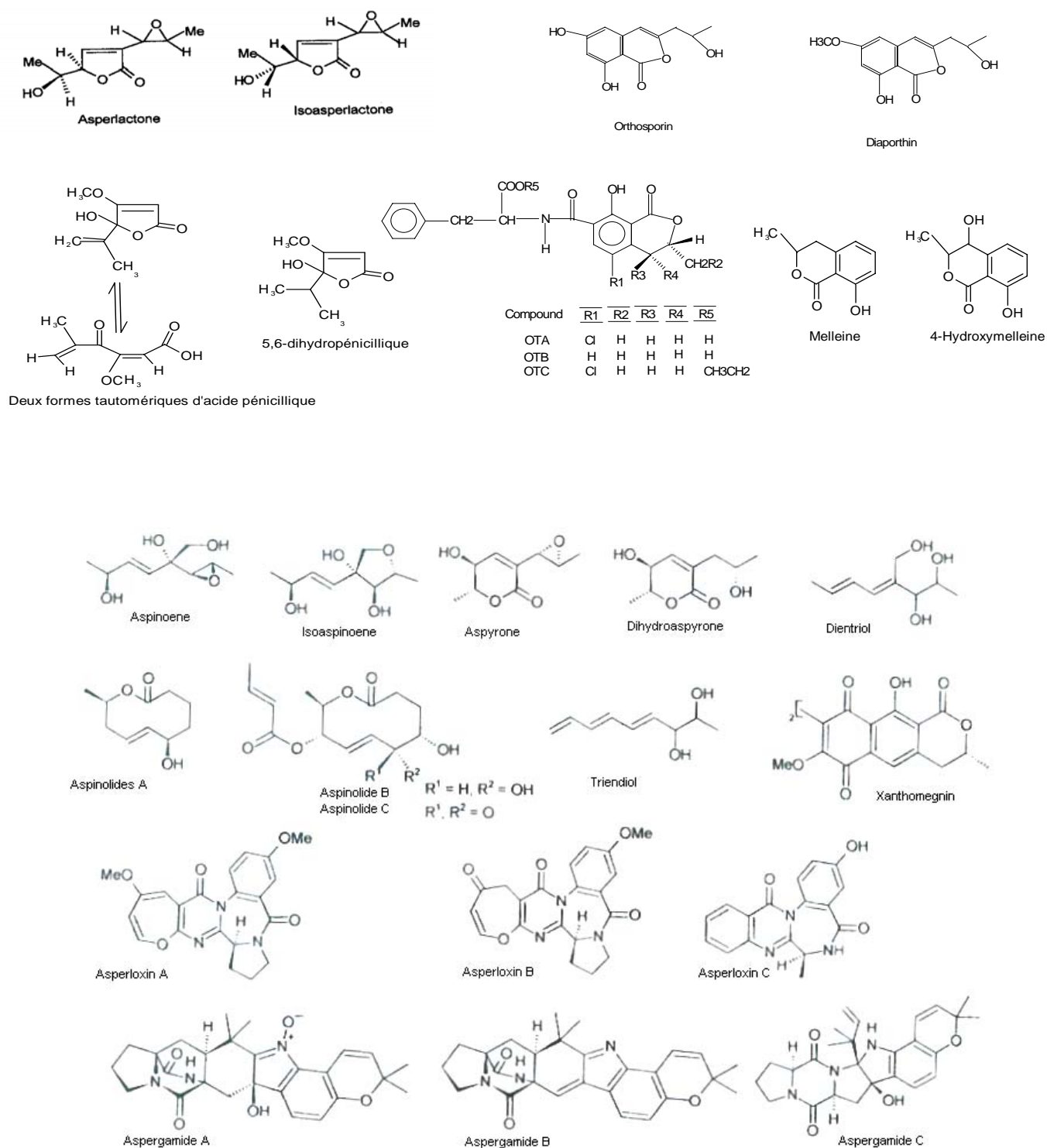
Les conidies d'*A. ochraceus* sont hyalines et rondes, de diamètre de 2,5-3,5 µm (Cahagnier *et al.*, 1998). Le conidiophore est rond, rugueux et pigmenté. *A. ochraceus* peut produire des sclérotés qui sont incolores au début, puis violacés à pourpres quand la culture est vieille.

*A. ochraceus*, champignon xérophile filamenteux, est largement répandu dans l'environnement. Ce champignon a été fréquemment isolé à partir des végétaux en décomposition, du sol, du désert. *A. ochraceus* est principalement responsable de la pourriture des semences et des graines. Il contamine plusieurs produits agricoles comme les céréales, le café, le raisin (Christensen et Tuthill, 1985, Kozakiewicz, 1989). La température de développement d'*A. ochraceus* est comprise entre 8 et 37°C avec un optimum variant entre 25 et 31°C. Il se développe encore bien à 15°C (donc adapté aux zones de stockage) avec une activité de l'eau de 0,79.

*A. ochraceus* a un double intérêt économique. Il est utilisé dans l'industrie de bioconversion de stéroïdes et d'alcaloïdes (Petroski *et al.*, 1983 ; Chen *et al.*, 1994) ainsi que dans la production d'enzymes (Charda et Garcha, 1992). Ce champignon est capable de produire plusieurs métabolites secondaires et particulièrement l'ochratoxine A. Il est aussi impliqué dans l'aspergillose du broncho-pulmonaire allergique (Novey et Wells, 1978).

## **II.2. Métabolites secondaires d'*A. ochraceus***

Les métabolites secondaires sont des métabolites non nécessaires au développement de l'organisme qui les produit. En effet, les mutants, ayant perdu la capacité de produire ces composés, peuvent toujours se développer. Les métabolites secondaires sont souvent synthétisés lorsque la phase stationnaire de croissance du microorganisme producteur est atteinte (Perry *et al.*, 2004). La voie de biosynthèse de ces produits est souvent longue, complexe, se faisant en plusieurs étapes et sous l'intervention de plusieurs enzymes. Par conséquent, la structure chimique des métabolites secondaires est généralement complexe. Cependant leur rôle dans la croissance de l'organisme producteur n'est pas bien connu.

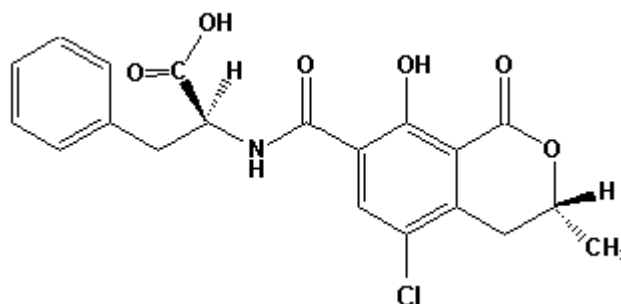


**Fig. 2.** Quelques métabolites secondaires synthétisés par *A. ochraceus* (d'après Van Der Merwe *et al.*, 1965 ; Steyn et Holzapfel, 1967 ; Durley *et al.*, 1975 ; Moore *et al.*, 1972 ; Obana *et al.*, 1995 ; Torres *et al.*, 1998 ; Richard *et al.*, 1999 ; Harris et Mantle, 2001 ; Bode *et al.*, 2002 ; Frisvad et Thrane, 2002)

*A. ochraceus* peut produire plusieurs métabolites secondaires (Fig. 2) dont les mycotoxines comme les ochratoxines, l'acide pénicillique, la viomelleine, la xanthomegnine ou bien des herbicides comme la melleine, l'hydroxymelleine. Plusieurs métabolites secondaires sont produits par *A. ochraceus* mais leurs propriétés biologiques ne sont pas encore déterminées.

## II.2.1 Ochratoxine A

En 1965, l'ochratoxine A (OTA) (Fig. 3) a été découverte pour la première fois chez *A. ochraceus* (Van der Merwe *et al.*, 1965). Elle est produite par deux genres fongiques : *Aspergillus* (*A. ochraceus*, *A. carbonarius*, *A. niger*, etc.) et *Penicillium* (*P. verrucosum*, *P. nordicum*, etc.). Le genre *Aspergillus* est bien adapté pour les climats chauds alors que *Penicillium* se développe bien dans climats tempérés. C'est pour cette raison que la présence d'OTA a été démontrée dans de nombreux produits agricoles de différentes régions du monde (Smith *et al.*, 1994). Par exemple l'OTA et ses champignons producteurs ont été trouvés dans les céréales et les produits dérivés, le café, le raisin, etc (Frisvad et Viuf, 1986; Pohland *et al.*, 1992; Wolff, 2000; Wolff *et al.*, 2000; Studer-Rohr *et al.*, 1995; Fazekas *et al.*, 2002).



**Fig. 3.** Structure chimique de l'OTA

L'OTA est constituée de deux parties importantes, une isocoumarine chlorée (3-méthyl-5-chloro-8-hydroxy-3,4-dihydroisocoumarine) liée par une liaison amide à la L-phénylalanine. La partie isocoumarine est un pentacétone synthétisé à partir d'une unité acétate et quatre unités malonates. En 1979, Huff et Hamilton ont proposé une voie hypothétique de biosynthèse dans laquelle la melleine et l'hydroxymelleine sont probablement des précurseurs d'OTA. Cependant, elle reste encore mal connue

aujourd'hui. Au niveau moléculaire, un gène de polycétone synthase a été identifié comme responsable de la production d'OTA chez *A. ochraceus* (O'Callaghan *et al.*, 2003). Récemment, chez *P. nordicum*, une partie du cluster de l'OTA a été séquencée. Les auteurs ont identifié un gène de peptide non ribosomal synthase, responsable de la ligation de la L-phénylalanine à la partie polycétone pour former la molécule d'OTA ainsi qu'un gène de polycétone synthase, responsable de la biosynthèse de la partie isocoumarine (Karolewicz *et al.*, 2004).

L'OTA est toxique pour l'homme et l'animal. Elle est potentiellement néphrotoxique chez toutes les espèces testées, à l'exception des ruminants adultes (Krogh, 1987; Kuiper-Goodman et Scott, 1989; Pohland, 1993). L'OTA est considérée comme un cancérogène rénal au moins lors d'une exposition à long terme. Elle a été classée dans le groupe 2B « cancérogène possible pour l'homme » par l'IARC (International Agency for Research on Cancer). Cette mycotoxine est tératogène chez l'animal. Elle provoque, par exemple, des anomalies morphologiques diverses chez le rat, la souris, le hamster, le porc et l'embryon de poulet. L'OTA affecte l'immunité cellulaire et humorale. Lea *et al.* (1989) ont montré dans une étude *in vitro* que l'OTA inhibe la prolifération des lymphocytes périphériques T et B et abolit la production d'interleukine 2 ainsi que ses récepteurs. Cette mycotoxine supprime l'activité des cellules tueuses ainsi que la production d'interférons (Luster *et al.*, 1987). Les différents tests sur les procaryotes pour évaluer la mutagénicité de l'OTA ont tous conduit à des résultats, soit faiblement positifs, soit négatifs. Les normes d'OTA tolérées par les pays européens dans les produits alimentaires ont été fixées à 3 µg/kg dans les produits de céréales, 5 µg/kg dans le cas des céréales, 5 µg/kg dans les grains de café, 2 µg/l dans le vin et le jus de raisin (Olsen *et al.*, 2003).

## **II.2.2. Acide pénicillique**

L'acide pénicillique (AP) (Fig. 2) a été découvert pour la première fois chez *P. puberulum* Bainier développé sur le maïs (Alsberg et Black, 1913). C'est une mycotoxine produite par plusieurs souches appartenant aux genres *Penicillium* et *Aspergillus* (Ciegler et Kurtzman, 1970; Smith et Moss, 1985; Nielsen, 2003). Parmi celles-ci, *A. ochraceus*, isolé à partir de produits alimentaires moisissés, a été signalé



comme producteur de l'AP (Sunesen et Stahnke, 2003). L'AP peut être produit en combinaison avec l'OTA dans des céréales ainsi que dans des aliments destinés aux volailles (Bacon *et al.*, 1970).

L'AP est un tétracétone dérivé de l'acide orsellinique (Sekiguchi *et al.*, 1987). Il peut exister sous deux formes tautomériques (Fig. 2). En milieu basique, la forme acide est prédominante; en milieu neutre, c'est la forme cyclique. Avec l'acide dihydropénicillique (ADHP), l'asperlactone, l'isoasperlactone et la patuline, il constitue une classe chimique de lactone cyclique à cinq membres relativement simple. La voie de biosynthèse proposée pour l'AP est similaire à celle de la patuline, cependant, peu de données sont disponibles sur les gènes responsables de sa formation (Zamir *et al.*, 1999).

L'AP possède des activités antitumorales et antibiotiques. Il peut induire également des ruptures d'ADN dans les cellules mammifères (Umeda *et al.*, 1977; Mori *et al.*, 1984). La dose létale (DL<sub>50</sub>) d'AP est de 100 mg/kg pour les souris. L'AP, dû à sa toxicité et sa carcinogénicité, est considéré comme un risque potentiel pour la santé humaine et animale (Shan *et al.*, 1997 ; Bando *et al.*, 2003). Il peut réagir avec certains acides aminés en donnant des produits moins nocifs (Shan *et al.*, 1997 ; Bando *et al.*, 2003).

### II.2.3. Melleine et Hydroxymelleine

*A. ochraceus* produit également de la melleine (3,4-dihydro-8-hydroxy-3-methylisocoumarine) et de la 4-hydroxymelleine (3,4-dihydro-4,8-dihydroxy-3-methylisocoumarine) (Fig. 2) (Sasaki *et al.*, 1970; Cole *et al.*, 1971). Ces deux métabolites sont aussi produits par d'autres espèces fongiques connues comme des contaminants ou des pathogènes importants des récoltes agricoles tels que *Aspergillus melleus* (Nishikawa, 1933), *Pezicula* sp. (Schulz *et al.*, 1995), *Botryosphaeria obtusa* (Venkatasubbaiah *et al.*, 1991), *Septoria nodorum* (Keller *et al.*, 1994), *Phoma tracheiphila* (Parisi *et al.*, 1993), *Apiospora camptospora* (Turner et Aldridge, 1983), *Cercospora taiwanensis* (Camarda *et al.*, 1976), *C. scirpicola* (Assante *et al.*, 1977), *Gyrostoma missouriense* (Turner et Aldridge, 1983), *Pezicula livida*, *Cryptosporiopsis malicorticis*, *Cryptosporiopsis* sp. et *Plectophomella* sp. (Krohn *et al.*, 1997).

La structure de la melleine et de l'hydroxymelleine est semblable à la partie dihydroisocoumarine de l'ochratoxine A. La melleine et la 4-hydroxymelleine possèdent

des activités herbicides. Elles sont très actives contre le melaleuca et le sorghum (Hoult et Paya, 1996). La melleine et ses dérivés peuvent être utilisés comme des inhibiteurs de l'HIV protéase. L'inactivation des protéases par des noyaux isocoumarines paraît résulter d'une attaque nucléophile entre le groupement carbonyle de l'isocoumarine et la serine ou la cystéine des sites enzymatiques (Bihel *et al.*, 2003). La melleine possède en plus une activité antifongique (Dai *et al.*, 2001). De plus, les isocoumarines pourraient être utilisées comme des précurseurs pour la biosynthèse de certains métabolites secondaires telle que la canescine, un métabolite d'*Aspergillus malignus* (Staunton et Sunter, 1988).

À l'exception de l'effet de la melleine sur les plantes, sur les larves de l'*Artemia saline* (Parisi *et al.*, 1993) ou sur les souris (Sasaki *et al.*, 1970), aucune donnée n'est disponible *in vivo* et *in vitro* sur les effets toxiques de melleine. Les DL<sub>50</sub> de melleine et de 4-hydroxymelleine injectés chez la souris par voie intraveineuse sont de 250 à 500 et de 1000 à 1500 mg/kg, respectivement (Sasaki *et al.*, 1970).

#### **II.2.4. D'autres métabolites secondaires**

*A. ochraceus* peut produire certains composés de la famille des lactones comme par exemple l'asperlactone, l'isoasperlactone, aspyrone (Fig. 2) (Garson *et al.*, 1984 ; Torres *et al.*, 1998). Ces métabolites sont également biosynthétisés par *A. melleus* (Garson *et al.*, 1984) et quelques d'autres espèces du genre *Aspergillus* (Rosenbrook et Carney, 1970). Staunton et Sutkowski (1991) ont montré que l'asperlactone, l'isoasperlactone et l'aspyrone sont dérivés d'un même précurseur chez *A. melleus*. L'asperlactone et l'isoasperlactone ont la même structure chimique mais ce sont deux isomères stéréochimiques. L'asperlactone est biosynthétisé à partir d'aspyrone par décarboxylation et arrangements des intermédiaires du polycétone suivis par l'ouverture stéréospécifique du cercle de l'époxy (Brereton *et al.*, 1984).

L'aspyrone peut inhiber la croissance (50%) de *Trichoderma* sp1 à 27 µg/ml. Il inhibe également la croissance de *Helminthosporium monoceras*, *Colletotrichum coccodes* (Torres *et al.*, 1998). L'asperlactone présente aussi des activités antifongiques et antibactériennes mais moins efficaces que l'aspyrone.

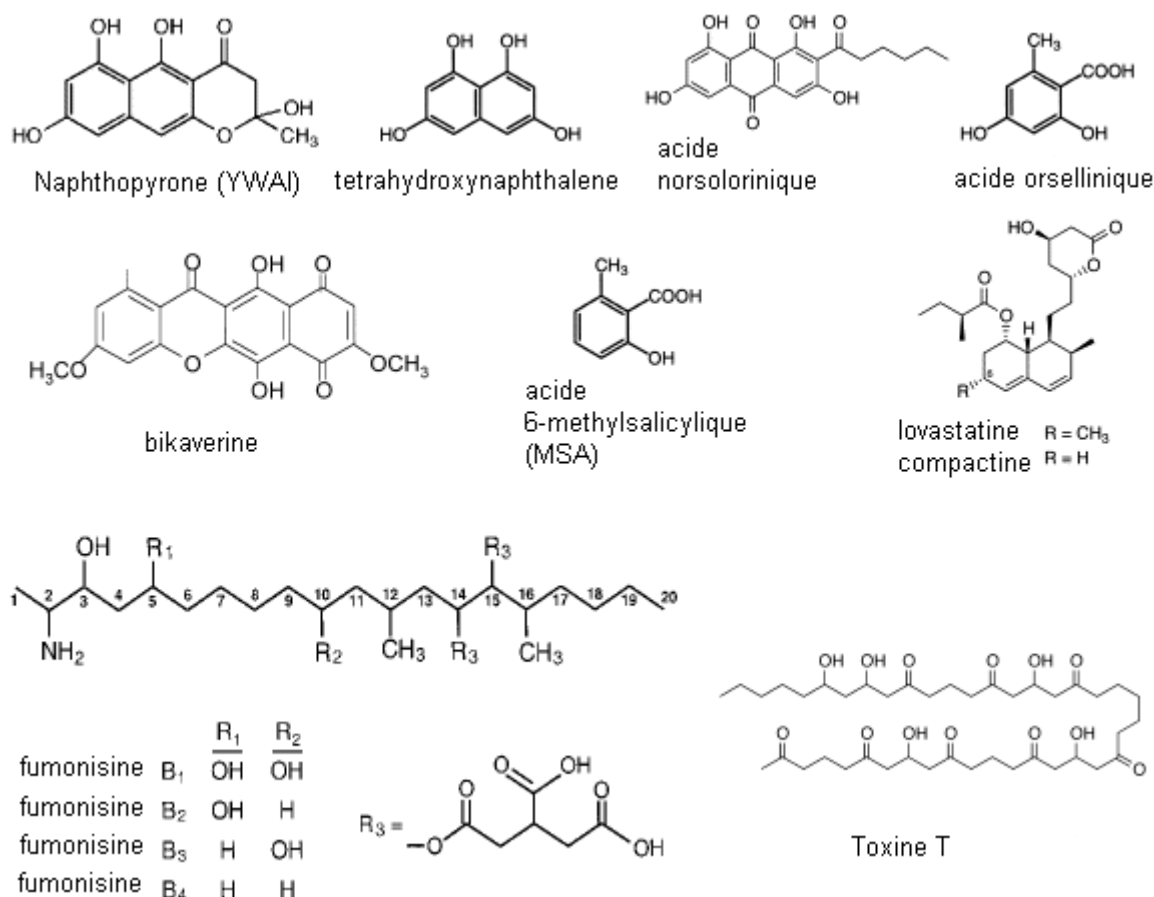
*A. ochraceus* produit également xanthomegnine et viomelleine (Robbers *et al.*, 1978 ; Zimmermann *et al.*, 1979). Ces deux mycotoxines causent la lésion rénale, la néphropathie chez le porc (Durley *et al.*, 1975 ; Hald *et al.*, 1983). Elles sont produites

par quelques espèces de *Penicillium* comme *P. cyclopium*, *P. viridicatum* isolés à partir des légumes, du riz, de l'orge (Stack et Mislivec, 1978 ; Hald *et al.*, 1983). La viomelleine et xanthomegnine ont été détectées dans l'orge (Hald *et al.*, 1983).

### III. Polycétones fongiques

Les polycétones sont des métabolites secondaires produits par des bactéries, champignons, plantes qui représentent une grande famille de produits naturels. On peut classer les polycétones en fonction de leur structure en quatre groupes : aromatiques (ex: tétracycline), macrolides (ex: érythromycine), polyéthers (ex: monensine), et polyenes (ex: amphotericine) (Shen *et al.*, 2000). Les polycétones naturels et les produits dérivés jouent un rôle important dans la médecine humaine et vétérinaire. En 2003, le chiffre d'affaires réalisé pour ces produits a dépassé 20 billions de dollars (Report of Biotica Company, 2005).

Les moisissures, en particulier les *Deuteromycetes* (champignons imparfaits), sont une source importante de polycétones dont la majorité est aromatique (O'Hagan, 1991). Cette famille de composés présente de grands intérêts pour l'industrie pharmaceutique, comme la lovastatine et la compactine (ou mevastine), utilisées dans le traitement de l'hypercholestérolémie, sont produites par *A. terreus* et *P. citrinum* respectivement (Hendrickson *et al.*, 1999 ; Abe *et al.*, 2002, Bill *et al.*, 2002). Cependant beaucoup de polycétones fongiques sont responsables de nombreux problèmes de santé humaine et animale comme les mycotoxines (ochratoxines, aflatoxines, fumonisine, patuline, acide pénicillique, toxine T, etc.). Parmi les polycétones fongiques, on trouve également des pigments, par exemple la mélanine chez *Colletotrichum lagenarium*. En contaminant les produits agricoles, les pigments fongiques peuvent modifier la qualité organoleptique voire la qualité nutritionnelle des ces produits. La figure 4 montre quelques exemples de polycétones fongiques bien connus.



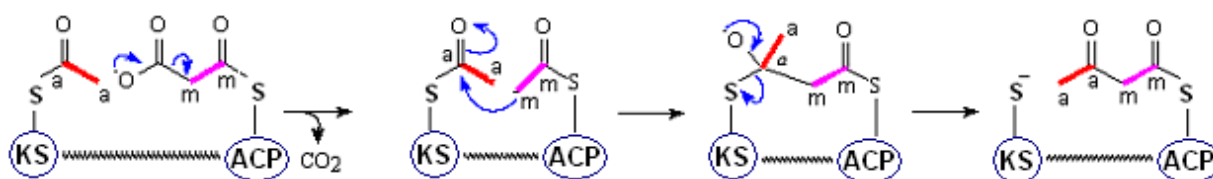
**Fig. 4.** Exemple de polycétones fongiques

Comme les métabolites secondaires en général, le rôle des polycétones chez les champignons en croissance n'est pas encore bien connu. Ces métabolites se rencontrent souvent associés à la sporulation des champignons. Le cas le plus étudié est la mélanine. Quelques fonctions lui ont été attribuées : protéger les champignons de l'irradiation, des températures extrêmes, de la lyse enzymatique ; être un facteur de virulence (Butler et Day, 1998). Ce pigment brun foncé contribue chez *C. lagenarium* non seulement à la survie des spores fongiques contre les UV mais est aussi un important facteur de virulence quand ce champignon infecte des plantes (Takano *et al.*, 2000). La biosynthèse de mélanine chez *C. lagenarium* est reliée avec la formation d'appressoria, un facteur nécessaire à l'infection et à la pénétration du champignon dans l'hôte (Keller *et al.*, 2002). Le rôle de ce pigment dans la virulence d'*A. fumigatus* a été confirmé sur le modèle de murine (Tsai *et al.*, 1998). La mélanine intervient dans le développement des spores d'*Alternaria alternata*. Chez un mutant de ce champignon,

déficient en mélanine, ses spores sont plus petites et plus sensibles aux UV que celles de la souche sauvage.

La production des mycotoxines semble aussi liée à la sporulation des champignons comme chez *A. nidulans*, *Claviceps purpurea*. Les mutants déficients en sporulation sont également affectés au niveau de production de mycotoxines. L'inhibition chimique de la sporulation de ces espèces engendre une chute de la quantité de toxine produite voire une incapacité à produire la toxine. Chez *Apergillus* sp. les mycotoxines sont produites au moment de la sporulation (Keller *et al.*, 2002).

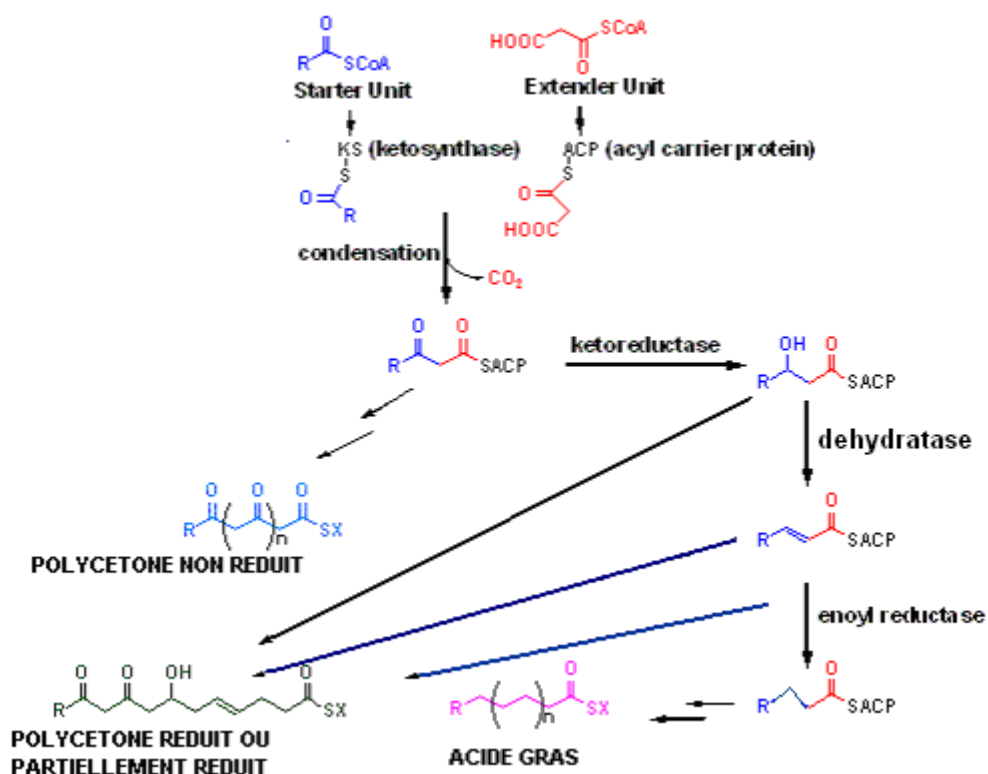
Bien que les structures des polycétones soient diverses, ils sont biosynthétisés par le même mécanisme. Le terme de polycétone a été introduit pour désigner ces composés dont la structure chimique possède une chaîne d'alternance de groupes cétone ( $>C=O$ ) et de groupes méthylène ( $-CH_2-$ ). Les polycétones dérivent de la condensation successive de petits acides carboxyliques dans un processus analogue à celui de la biosynthèse des acides gras. La formation de la chaîne de carbones du polycétone est le résultat de la condensation tout d'abord d'un acetyl-CoA (une unité acétate) et d'un malonyl-CoA (une unité malonate) (Fig. 5), puis de la prolongation par condensation successive des groupements acyles. Cette condensation est catalysée par un enzyme appelé polycétone synthase (PKS). Ce squelette subit plusieurs modifications telles que la cyclisation, réduction, méthylation et donne une famille très diverse de polycétones.



**Fig. 5.** Formation de la liaison C-C à partir d'une unité acétate (a) et malonate (m) dans la première réaction de condensation conduisant à la chaîne de polycétone (d'après Stanforth, 1998).

Dans le cas des acides gras, la chaîne de carbones est répétitivement synthétisée à partir d'unité malonate jusqu'au moment où elle atteint la longueur souhaitée. Le

groupement  $\beta$ -cétone est successivement réduit en hydroxyle, puis déshydraté et finalement réduit encore une fois pour générer une chaîne de carbones saturée (Fig. 6).



**Fig. 6.** Comparaison de la synthèse d'un acide gras et d'un polycétone.  
(d'après Gokhale et Tuteja, 2001)

Contrairement à un acide gras, les groupements  $\beta$ -cétone des polycétones ne sont pas systématiquement réduits mais le niveau de réduction des polycétones varie d'une molécule à une autre (Fig. 6). On peut donc classer les polycétones en trois groupes :

- les polycétones réduits : OTA, compactine, lovastatine, toxine T. Tous les groupements  $\beta$ -cétone, ou presque, de la chaîne de carbones sont réduits.
- les polycétones partiellement réduits : MSA. Un seul cycle de réduction/déshydratation est nécessaire durant sa synthèse.
- les polycétones non réduits : acide norsolorinique, acide orsellinique, pigment de spore YWA1. La formation de ces polycétones ne demande pas la réduction (Nicholson *et al.*, 2001).

La diversité des polycétones se fait également sur le nombre d'unités malonates condensées dans la formation de la chaîne de carbones. Ainsi les dicétones sont formés

à partir d'une unité acétate et une unité malonate par un seul cycle de condensation, par exemple le dicétone de la compactine, dicétone de la lovastatine. La condensation des dicétones avec une unité malonate donne les tricétones. Ainsi de suite on a des tétracétones (acide orsellinique, 6-methylsalicylique), pentacétones (melleine, ochratoxine A), etc.

## **IV. Polycétone synthases (PKS)**

### **IV.1. Structure d'une PKS**

Dans le cas d'un polycétone, l'enzyme catalysant l'assemblage du squelette initial est appelé polycétone synthase. Toutes les PKS peuvent posséder l'un et/ou l'autre des domaines enzymatiques suivants: ketosynthase (KS), acyl transférase (AT), ketoreductase (KR), enoyle reductase (ER), méthyltransférase (MT); acyle carrier protein (ACP) et thioestérase (TE). Cependant AT, KS, ACP sont les trois domaines principaux tandis que les autres sont optionnels. Le domaine ketosynthase (KS) est le domaine le plus conservé. Il catalyse la réaction de condensation. Le domaine AT transfère des composants de précurseurs acyl-CoA à l'ACP qui « tient » la chaîne du polycétone en condensation et prépare les précurseurs transportés par AT pour la condensation suivante. Le domaine KR réduit le groupe  $\beta$ -cétone en fonction alcoolique; le DH élimine l'eau de la fonction alcoolique pour former un thioester insaturé; le domaine ER catalyse la dernière réduction du groupe enoyle en groupe alcyle; le domaine MT catalyse l'addition d'un groupe méthyle; et enfin le domaine TE catalyse la cyclisation ou déplace le produit final du complexe PKS une fois que la biosynthèse se termine.

Chaque champignon peut avoir quelques dizaines de PKS. En fonction de la présence/absence des domaines actifs optionnels KR, DH et ER, une PKS peut générer un polycétone non réduit, partiellement réduit ou réduit. Plusieurs études ont été réalisées sur la classification des PKS fongiques. Les PKS fongiques sont donc souvent divisées en 3 classes principales en fonction du niveau de réduction du polycétone final. Quelques exemples sont montrés dans le Tableau 3.

**Tableau 3.** Organisation des domaines actifs de la PKS et niveau de réduction du polycétone

Espèce	gène	Domaine actif	aa	Métabolite	Structure	Réduction	Référence
<i>A. terreus</i>	<i>lovF</i>	KS-AT-DH-MT-ER-KR-ACP	2500	Lovastatine	Dicétone	R	Hendrickson <i>et al.</i> , 1999.
<i>P. citrinum</i>	<i>mlcB</i>	KS-AT-DH-MT-ER-KR-ACP	2563	Compactine	Dicétone	R	Abe <i>et al.</i> , 2002
<i>A. terreus</i>	<i>lovB</i>	KS-AT-DH-(MT)-KR-ACP	3039	Lovastatine	Nonacétone	R	Hendrickson <i>et al.</i> , 1999.
<i>P. citrinum</i>	<i>mlcA</i>	KS-AT-DH-(MT)-KR- ACP	3032	Compactine	Nonacétone	R	Abe <i>et al.</i> , 2002
<i>A. terreus</i>	<i>pksL2</i>	KS-AT-DH-KR-ACP	1766	Patuline	Tétracétone	PR	Feng et Leonard, 1998
<i>P. patulum</i>	<i>MSAS</i>	KS-AT-DH-KR-ACP	1774	Patuline	Tétracétone	PR	Beck <i>et al.</i> , 1990
<i>A. parasiticus</i>	<i>pksL1</i>	KS-AT - ACP- TE	2913	Aflatoxine	Décacétone	NR	Feng et Leonard, 1995
<i>A. nidulans</i>	<i>pksST</i>	KS-AT- ACP- ACP – TE	2181	Stegmatocystine	Décacétone	NR	Yu et Leonard, 1995
<i>A. nidulans</i>	<i>wA</i>	KS-AT-ACP-ACP	1981	Pigment	Heptacétone	NR	Mayorga et Timberlake, 1992
<i>C. heterostrophus</i>	<i>pks1</i>	KS-AT-DH-ER-KR-ACP	2530	Toxine T	(ND)	R	Yang <i>et al.</i> , 1996
<i>C. lagenarium</i>	<i>pks1</i>	KS-AT-ACP-ACP-TE	2187	Naphtalene	Pentacétone	NR	Takano <i>et al.</i> , 1995
<i>G. fujikuroi</i>	<i>Fum5</i>	KS-AT-DH-MT-ER-KR-ACP	2607	Fumonisine	Décacétone	R	Proctor <i>et al.</i> , 1999
<i>G. fujikuroi</i>	<i>pks4</i>	KS-AT-ACP-TE	2009	Bikaverin	Nonacétone	NR	Linnemannstöns <i>et al.</i> , 2002

NR : non réduit, PR : partielle réduit, R : réduit ; ND : non déterminé



a) La première classe comprend des PKS qui synthétisent les polycétones réduits, souvent linéaires comme la lovastatine (produite par *A. terreus*), la compactine (*P. citrinum*), la citrinine (*M. ruber*), la fumonisine (*F. moniliform*), la toxine T (*F. tricinctum*). Cette classe peut être divisée en 4 sous-classes.

Les dicétones synthases de la lovastatine/compactine sont des PKS typiques de la première sous-classe. Ces PKS catalysent la formation des polycétones linéaires et contiennent pour la plupart tous les domaines actifs : KS-AT-DH-(MT)-ER-KR-ACP. Cependant pour certaines PKS, le domaine ME est non actif (Kroken *et al.*, 2003).

Les nonacétones synthases de la lovastatine/compactine caractérisent les PKS de la deuxième sous-classe. Ces PKS n'ont pas de domaine ER, cependant elles peuvent avoir un domaine de condensation (CON) de type non ribosomal peptide synthase (NPS) ou un module NPS complet (CON-AMP (adenylation)-ACP). La structure de ces PKS est donc KS-AT-DH-(MT)-KR-ACP-(CON)-(AMP-ACP).

Les PKS de la troisième sous-classe ne contiennent pas le domaine MT mais peuvent avoir un deuxième domaine ACP comme la PKS2, responsable de la production de toxine T chez *C. heterostrophus* (Kroken *et al.*, 2003). La structure de ces PKS est KS-AT-DH-ER-KR-ACP-(ACP).

La dernière sous-classe comprend des PKS avec la présence/absence du domaine MT, par exemple la FUM1, responsable de la polycétone linéaire dans la biosynthèse de fumonisine chez *G. moniliformis*.

b) La deuxième classe est liée aux PKS de type acide 6-methylsalicyclique synthase (MSAS) qui produisent des polycétones partiellement réduits (Bingle *et al.*, 1999, Nicholson *et al.*, 2001 ; Kroken *et al.*, 2003). Plusieurs PKS de cette classe ont été caractérisées comme MSAS dans la voie de biosynthèse de patuline chez *P. patulum* (Beck *et al.*, 1990), MSAS chez *A. terreus* (Feng et Leonard, 1998). Ces PKS contiennent les domaines actifs suivants : KS, AT, DH, KR et ACP.

c) La troisième classe est réservée aux PKS responsables de la production des polycétones non réduits, ou réduits par d'autres enzymes que la PKS. Cette classe correspond aux PKS de type WA d'après la classification de Bingle *et al.* (1999). Par exemple la réduction de tétrahydroxynaphtalène (THN) par la phénol réductase dans la biosynthèse de mélanine chez *C. lagenarium* (Cox, 2002). Les polycétones générés à partir

des PKS de cette classe sont généralement cycliques (ex : les précurseurs de la mélanine, des pigments de spore, des aflatoxines). Les PKS de cette classe ne contiennent pas les domaines ER, DH et KR, ce qui explique l'absence de leurs activités réductrices. Elles peuvent avoir en plus d'autres domaines ACP et un domaine Claisen-type cyclase au terminus C (Kroken *et al*, 2003).

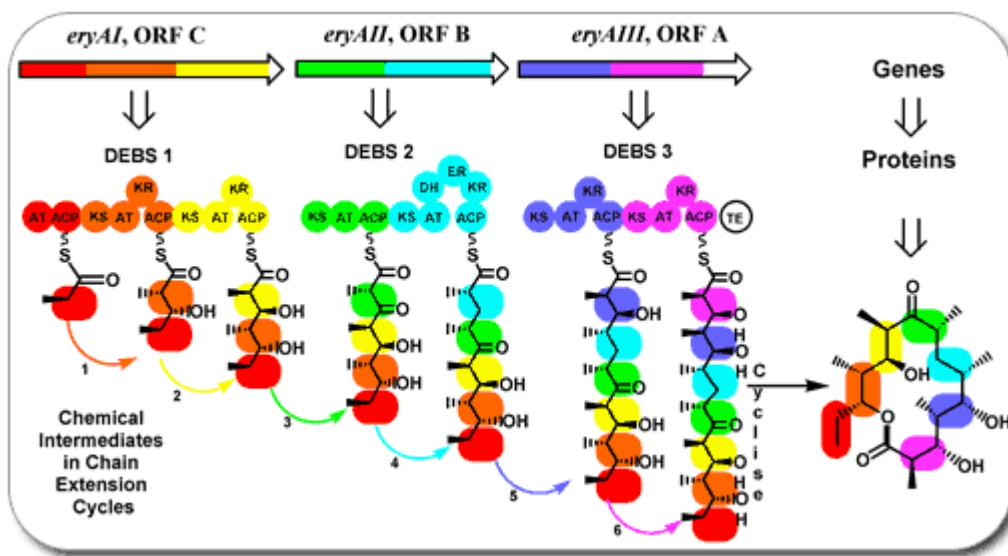
## IV.2. Différents types de PKS

Les PKS sont classées en trois types en fonction de leur organisation génique.

a) Les PKS de type I sont des protéines multifonctionnelles que l'on trouve chez les bactéries, les plantes ainsi que chez les champignons. Elles sont divisées en deux :

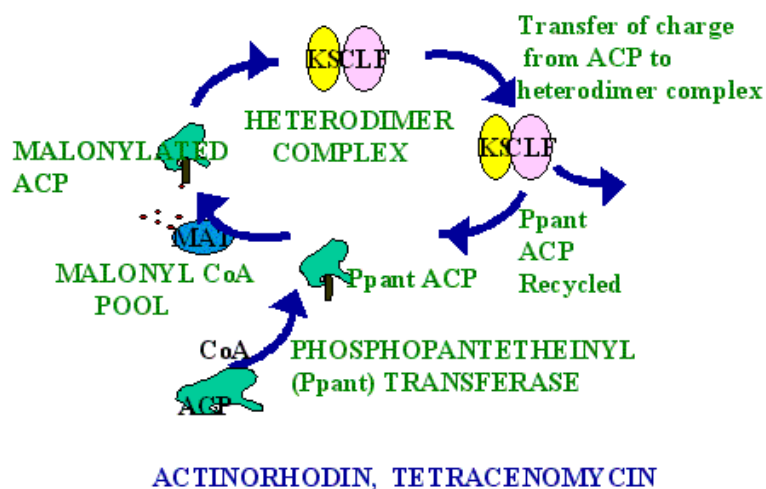
- les PKS modulaires de type I : c'est le cas de la PKS responsable de la biosynthèse d'érythromycine A chez *Saccharopolyspora erythraea* (Fig. 7). Ces PKS modulaires regroupent des sites actifs, appelé module, sur un même polypeptide utilisé pour synthétiser la chaîne de carbones. Les sites actifs de chaque module sont utilisés une seule fois durant l'assemblage de la molécule et déterminent le choix des unités de structure et le niveau de réduction ou de déshydratation pour le cycle d'extension qu'ils catalysent. La longueur de la chaîne de carbones et le nombre de cycles de réaction sont déterminés par le nombre et l'ordre des modules dans les polypeptides constituant la PKS.

- les PKS itératives de type I : c'est le cas de la PKS responsable de la production d'aflatoxines chez *A. flavus*. Ces PKS itératives utilisent d'une façon répétitive leurs sites actifs durant la construction de la chaîne de carbones à partir des unités acétates et malonates. Pour les PKS catalysant les composés aromatiques, tels que le 6-MSA, les pigments de spore, la procédure fait intervenir un seul enzyme de type I avec une réaction de réduction ou non. La déshydratation a lieu après la réaction d'aldol qui forme le cycle aromatique. Pour les polycétones non aromatiques, la PKS peut déterminer le niveau de réduction/déshydratation à chaque étape de la voie de biosynthèse ainsi que la longueur de la chaîne de carbones.



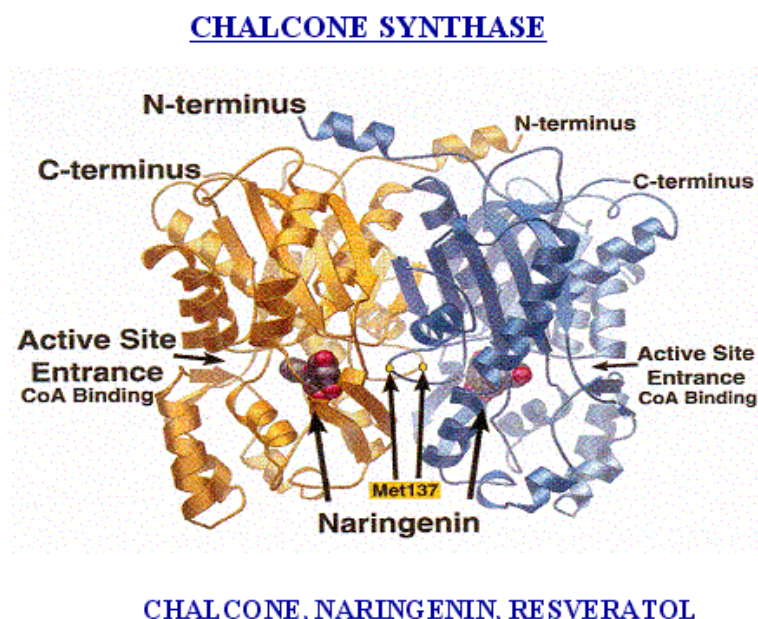
**Fig. 7.** Organisation des domaines actifs d'érythromycine synthase chez *S. erythraea*. Les domaines d'élongation (KS, AT et ACP) sont présents dans tous les modules. Seuls certains modules possèdent les activités réductrices avec la présence de KR, DH et ER. (d'après Donnelley, 2002).

b) Les PKS de type II sont des complexes de protéines monofonctionnelles, trouvées chez les bactéries. Un des exemples est la PKS responsable de l'actinorhodine chez *Streptomyces coelicolor* (Fig. 8). Ces PKS catalysent la formation des composés qui nécessitent des étapes d'aromatisation et de cyclisation mais pas de cycles de réduction ou de déshydratation.



**Fig. 8.** Actinorhodine synthase, PKS de type II (D'après Khosla *et al.*, 1999)

c) Les PKS de type III sont des enzymes homodimeriques par exemple les chalcones synthases, stibene synthases isolées chez les plantes ou les polyhydroxy phenol synthases isolées chez les bactéries (Fig. 9). Ces PKS n'ont pas de domaine ACP comme les autres PKS.



**Fig. 9.** PKS de type III (D'après Khosla *et al.*, 1999)

La plupart des PKS fongiques sont des PKS itératives de type I. Récemment, les PKS de type III ont été découvertes chez quelques champignons comme *A. oryzae*, *Neurospora crassa* et *F. graminearum* (Seshime *et al.*, 2005). Cela ouvre de nouvelles perspectives dans la recherche des polycétone fongiques ayant de bioactivités intéressantes.

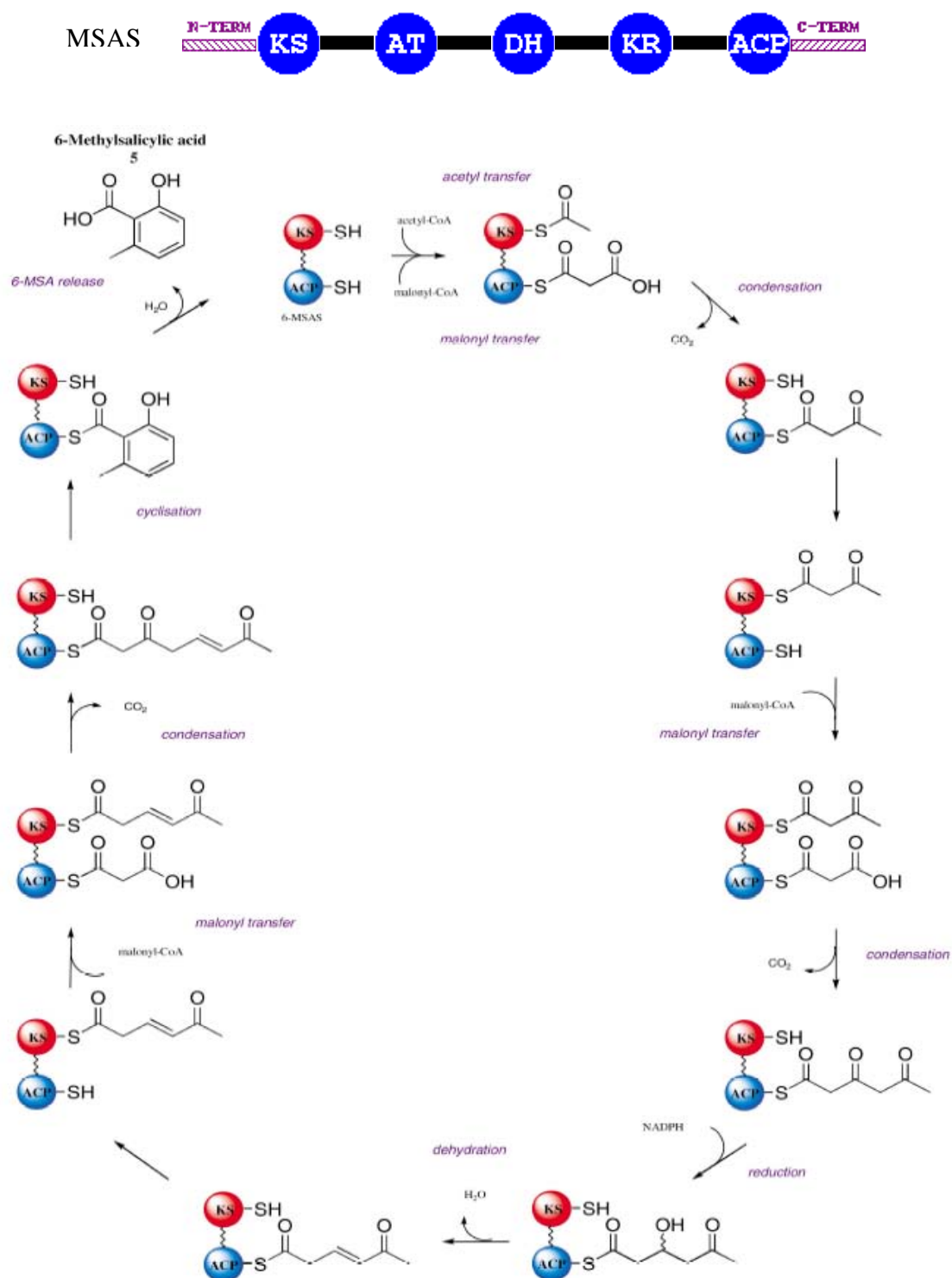
### **IV.3. Fonction des PKS fongiques**

Les PKS fongiques font parties des PKS de type I dont l'organisation génique est similaire à celle des acides gras synthases (FAS). Ce sont des enzymes multifonctionnels, pour la plupart itératifs, qui utilisent d'une façon répétée leurs sites actifs pour synthétiser la chaîne du polycétone. Les PKS non itératives effectuent un seul cycle de condensation et

forment un dicétone. Deux exemples sont choisis, la MSAS et les PKS de la compactine pour illustrer l'organisation et la fonction des PKS fongiques.

#### **IV.3.1. Acide 6-methylsalicylique synthase (MSAS) chez *P. patulum***

La MSAS est une PKS fongique itérative de type I dont le gène a été séquencé chez *P. patulum* et *A. terreus* (Beck *et al.*, 1990 ; Feng et Leonard, 1998). Chez *P. patulum*, le gène de la MSAS présente un seul cadre de lecture ouvert codant pour une protéine de 1774 acides aminés et de 190 KDa (Beck *et al.*, 1990). Cette PKS contient dans l'ordre les cinq domaines actifs suivants : KS, AT, DH, KR et ACP (Fig. 10A). La MSAS catalyse la formation de 6-MSA à partir d'une molécule acétate et trois molécules malonates. En utilisant itérativement les domaines actifs, le 6-MSA est synthétisé via trois cycles d'extension avec différents niveaux de réduction (Fig. 10B). La première condensation est suivie directement par la réaction avec une unité malonate tandis que la deuxième condensation est suivie par une réduction et déshydratation du groupe cétone qui vient d'être formé. Après le troisième cycle, le squelette subit une cyclisation, déshydratation puis une enoylisation en donnant le 6-MSA. La MSAS nécessite la présence de NADH pour son activité réductrice. Sans NADH, un acide triacétique est généré au lieu de MSA. L'absence du domaine TE suggère que le largage de la molécule de 6-MSA à partir du complexe PKS n'est pas réalisé par l'hydrolyse mais par un autre mécanisme (O'Hagan, 1991).



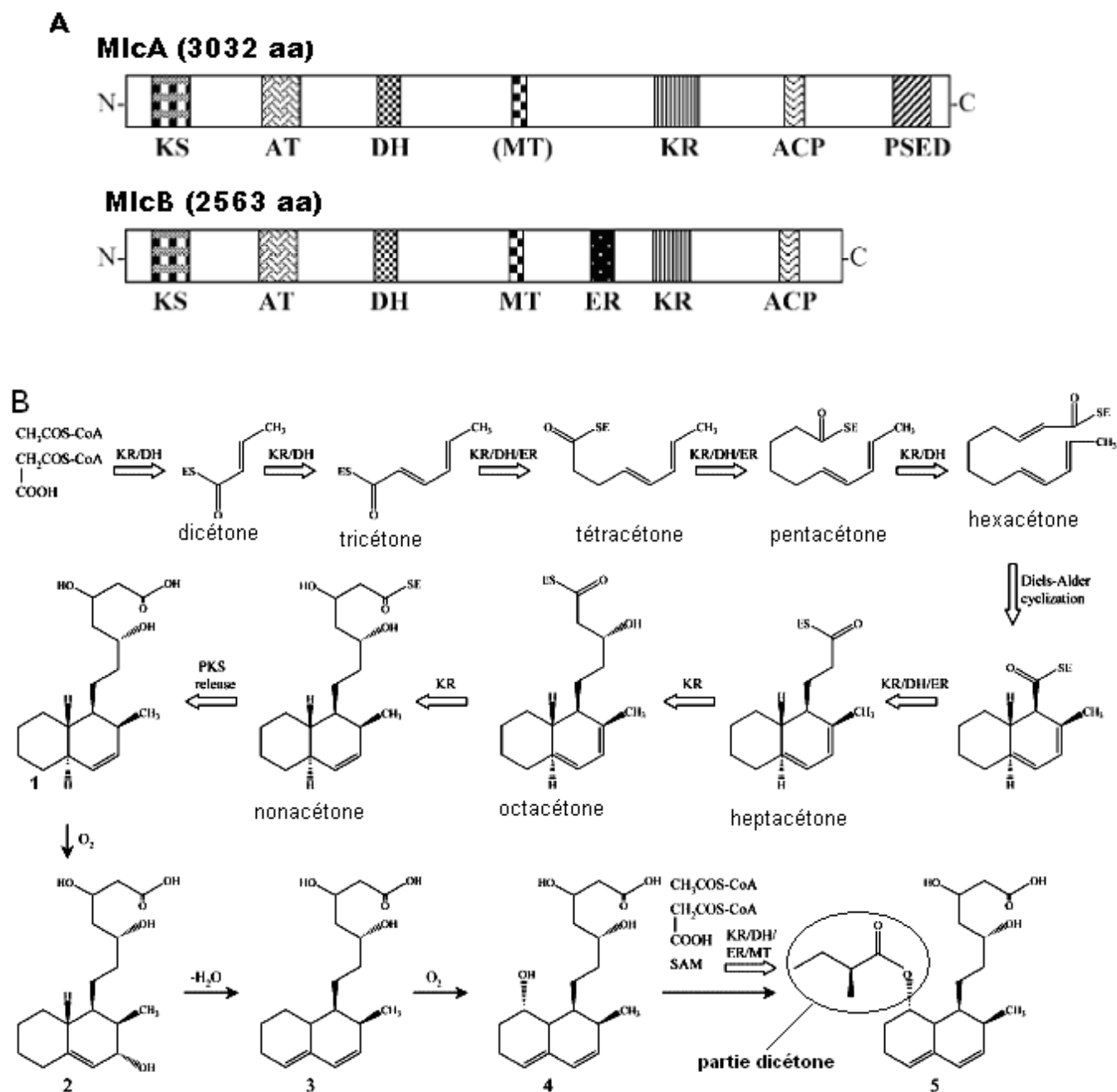
**Fig. 10.** Biosynthèse d'acide 6-méthylsalicyclique (d'après Staunton et Weissman, 2001)

#### IV.3.2. PKS de la compactine chez *P. citrinum*

La compactine (ML-236B) est un inhibiteur potentiel de 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) réductase, produite par *P. citrinum*. Elle peut être convertie en sodium de pravastatine, un médicament utilisé dans le traitement d'hypercholestérolémie (Endo *et al.*, 1976). La compactine est composée de deux polycétones, le nonacétone et le dicétone, liés par une liaison ester (5, Fig. 11B), respectivement synthétisés par deux PKS distinctes : MlcA et MlcB. La structure chimique de la compactine est très proche de celle de la lovastatine (produite par *A. terreus*), chez laquelle le groupe méthyle en C-6 du nonacétone est introduit à partir du S-adenosyl-L-méthionine (SAM) par l'activité du domaine MT (Abe *et al.*, 2002).

L'organisation des domaines actifs de la compactine nonacétone synthase et la dicétone synthase est schématisée comme dans la Fig. 11A. Les domaines KS, AT, DH, KR et ACP sont trouvés chez MlcA et MlcB. Un domaine d'élongation de peptide synthase (Peptide synthase elongation domain, PSED) qui catalyse la formation de la liaison peptidique est identifié pour MlcA. Seule MlcB possède le domaine ER. Le domaine MT est présent chez les deux PKS mais celui de MlcA est probablement inactif.

La voie de biosynthèse de compactine chez *P. citrinum* est proposée dans la Fig. 11B. Le 4a,5-Dihydro ML-236C (1), synthétisé par la MlcA à partir d'une molécule acétate et huit molécules malonate, est probablement le premier intermédiaire. La conversion de (1) en ML-236-A (4) via 3 $\alpha$ -hydroxy-3,5 dihydro ML-236C (2) et ML-236C (3) demandent des enzymes d'oxydation et de déshydratation. La molécule 2-methylbutyrate produite par MlcB est reliée à ML-236B sous l'action d'un enzyme transesterase MlcH.



**Fig. 11.** Organisation des domaines catalytiques des PKS (A) et biosynthèse de la compactine (B) chez *P. citrinum*. Les grandes flèches indiquent les étapes probablement catalysées par les deux PKSs, MlcA ou MlcB. L'activité des domaines KS, AT et ACP est demandée pour la condensation/extension de la chaîne de carbone; l'intervention de KR, DH, ER ou MT est aussi montrée (si nécessaire) à chaque réaction. Le rôle du domaine PSED n'est pas encore connu (Abe *et al.*, 2002).



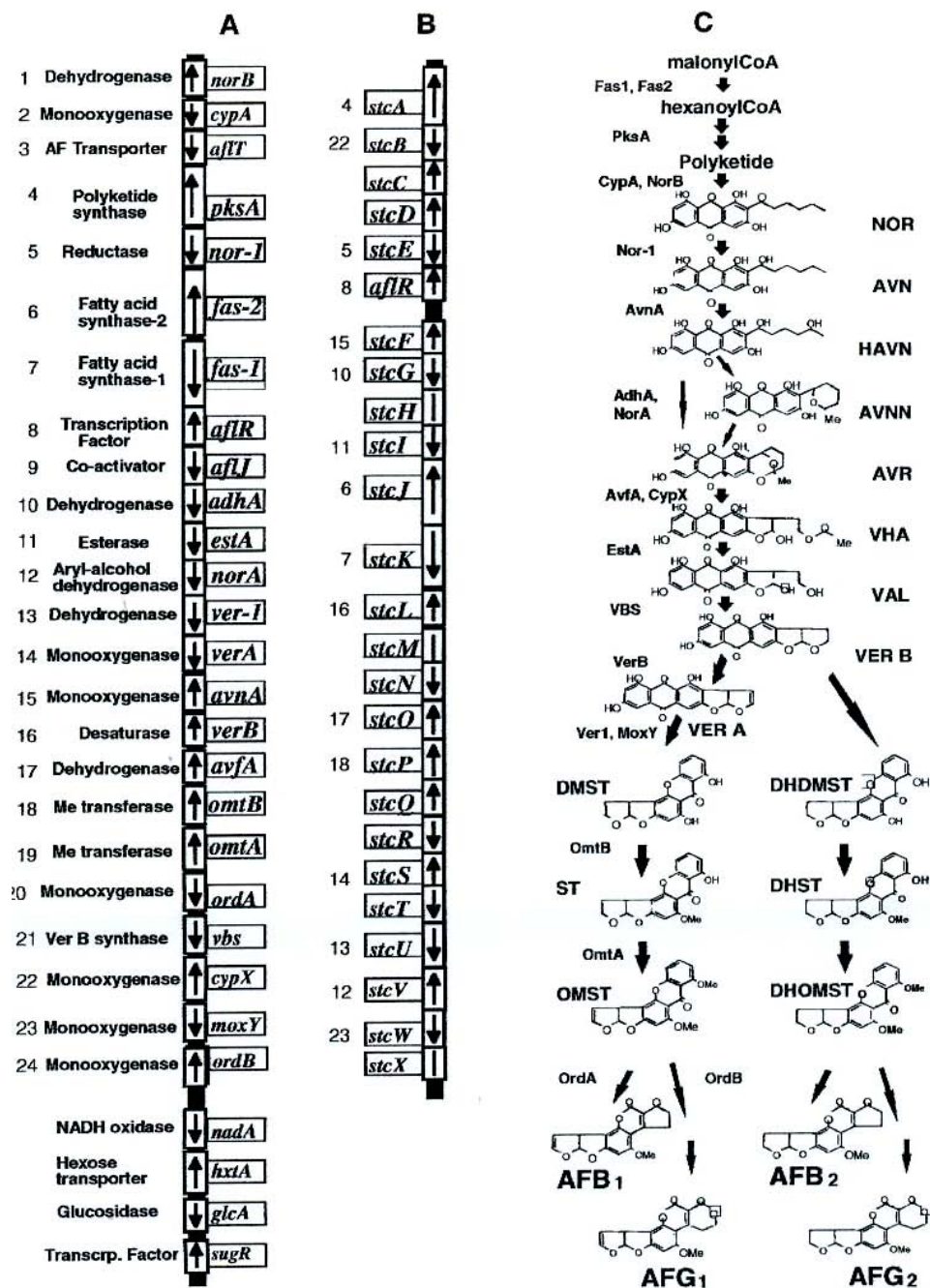
## **IV.4. Organisation des gènes de la voie de biosynthèse d'un polycétone**

### **IV.4.1. Organisation des gènes en cluster**

L'adaptation d'un organisme aux conditions environnementales nécessite la coopération de plusieurs gènes qui contribuent à sa survie. Dans une chaîne métabolique, le produit d'une réaction enzymatique doit être très rapidement repris par l'enzyme suivant afin d'assurer une vitesse correcte de formation du produit final et d'éviter d'être détruit par des réactions parasites possibles. Il existe donc une nécessité d'assemblage enzymatique sous forme complexe ou cluster enzymatique (Kamoun *et al.*, 2003). Si les gènes sont fortement liés, ils pourront former des unités. Les gènes catalysant des métabolites secondaires sont en général organisés en cluster. Plusieurs clusters de polycétones sont identifiés chez les bactéries ainsi que chez les champignons. Par exemple, le cluster de l'érythromycine chez *S. erythraea* est composé de 22 gènes dont trois codent pour les protéines multifonctionnelles : DEBS1, DEBS2 et DEBS3 ; le cluster de la rapamycine chez *S. hyroscopicus* contient aussi trois gènes codant pour les protéines multifonctionnelles : RAPS1, RAPS2 et RAPS3, et 24 gènes (Lal *et al.*, 2000). Chez les champignons, plusieurs clusters codant pour des polycétones sont étudiés. Il s'agit surtout du cluster de la biosynthèse d'aflatoxines et celui de lovastatine chez *A. flavus* et *A. terreus* respectivement. La production de ces métabolites est sous contrôle des clusters qui regroupent tous les gènes (ou presque) de la voie de biosynthèse de la molécule.

### **IV.4.2. Voie de biosynthèse des aflatoxines chez *A. flavus***

Les aflatoxines, un groupe de polycétones dérivés de furanocoumarine produit par de nombreuses espèces du genre *Aspergillus* comme *A. flavus* et *A. parasiticus*, sont parmi les mycotoxines connues les plus toxiques et carcinogéniques. Au moins 16 structures d'aflatoxines et leurs analogues sont caractérisées mais seulement 4 sont des aflatoxines majeures, AFB1, AFB2, AFG1 et AFG2, contaminant des produits agricoles et posant des problèmes pour la santé humaine.



**Fig. 12.** Comparaison du cluster d'aflatoxines (AF) chez *A. flavus* (A) et celui de stérigmatocystine (ST) chez *A. nidulans* (B). Les flèches indiquent le sens de transcription du gène. Les gènes homologues entre deux clusters sont numérotés par le même chiffre. Les étapes de la voie de biosynthèse sont schématisées par (C). AVN : averantine, HAVN : 5'-hydroxyaveratine, AVNN : averufanine, VHA : versiconal hemiacetal acetate, VAL : versiconal, DHDMST : dihydrodemethylstigmatocystine, DHOMST : dihydro-O-methylsterigmatocystine, OMST : O-methylsterigmatocystine (Bhatnagar *et al.*, 2003)

Chez *A. flavus*, au moins 25 gènes responsables de la production d'aflatoxines ont été identifiés. Ces gènes sont regroupés dans un cluster de 70 kb (Fig. 12), qui est composé de trois grands gènes : deux sous unités acides gras synthases (*Fas1* 5,8 kb et *Fas2* 5,1 kb), une PKS de 6,6 kb (*pksA*) et de 22 gènes de taille moyenne d'environ 2 kb. Il est délimité par une région de 2 kb non codant à l'extrémité 5', et par un cluster des gènes d'utilisation de sucre à l'extrémité 3' (Bhatnagar *et al.*, 2003 ; Yu *et al.*, 2004). Certaines espèces d'*Aspergillus*, *A. nidulans* par exemple, produisent des précurseurs d'aflatoxines comme le stérigmatocystine. Le cluster de ce dernier a des gènes communs avec ce lui d'aflatoxines mais ils ne sont pas dans le même ordre (Fig. 12).

La biosynthèse des aflatoxines débute par la conversion des malonyl-CoA en un polycétone noranthrone (Fig. 12) par deux acides gras synthases (Fas-1 et Fas-2) et une PKS (PksA). La conversion de noranthrone en acide norsolorinique (NOR), le premier intermédiaire stable, est probablement assurée par la monooxygénase CypA et la déhydrogénase NorB (Bhatnagar *et al.*, 1992). Le NOR peut être ensuite transformé en averantine (AVN) par la déhydrogénase Nor-1 ou NorA. Quelques étapes de conversion de AVR en versicolorine B (VERB) ne sont pas encore établies. Cette conversion est probablement catalysée par les enzymes CypX, MoxY et AvfA. La versicolorine A est transformée en demethylsterigmatocystine (DMST) par une ketoreductase Ver1 et une cytochrome P450 monooxygénase VerA. L'étape finale est la conversion de O-methylsterigmatocystine (OMST) ou dihydro-O-methylsterigmatocystine (DHOMST) en aflatoxines B1, B2, G1 et G2 en présence de l'enzyme NADPH-dépendant monooxygénase OrdA.

Les études ont montré que dans les deux clusters, aflatoxines et stérigmatocystine, le gène *aflR* joue le rôle d'un régulateur. Il code pour une protéine spécifique de type zinc DNA-binding. Il est nécessaire à l'activation de la transcription de la plupart des gènes de structure. La transcription de la voie de biosynthèse d'aflatoxines peut être activée quand la protéine AflR se fixe sur la séquence palindromique 5'-TCGN<sub>5</sub>CGA-3' de la région promotrice des gènes de structure comme démontré chez *A. nidulans*, *A. flavus* et *A. parasiticus*. Chez *A. sojae*, une souche non productrice d'aflatoxines utilisée dans l'industrie alimentaire, le gène *aflR* est défectif.

Récemment quelques nouveaux gènes dont le rôle dans la production d'aflatoxines n'a pas encore été confirmé ont été isolés dans le cluster des aflatoxines (Yu *et al.*, 2004). Certaines études essaient d'expliquer l'organisation des gènes de la même voie de biosynthèse en un cluster cependant aucune explication ne paraît être satisfaisante car il manque des évidences. L'organisation en cluster n'est pas obligatoirement nécessaire pour tous les métabolites secondaires. C'est par exemple le cas de la biosynthèse de mélanine qui est en cluster chez *A. alternata* mais pas chez *C. lagenarium* (Keller et Hohn, 1997). Walton (2002) a suggéré que cette organisation permette de réguler en coordination l'ensemble de la voie de biosynthèse. Geisen *et al.* (1998, 2000) ont proposé que l'organisation en cluster assure sa résistance au cours de l'évolution. Il existe également la possibilité qu'un gène extérieur au cluster participe à la même voie de biosynthèse avec les gènes du cluster.

#### **IV.5. Régulation de la biosynthèse des polycétones**

La biosynthèse des métabolites secondaires y compris des polycétones est fortement affectée par les conditions environnementales et nutritionnelles dans lesquelles l'organisme fongique se développe. Les conditions optimales pour la production d'un métabolite ne sont pas nécessairement les mêmes que pour la croissance maximale. De plus, un champignon est capable de produire différents métabolites secondaires à différents niveaux en fonction de la composition du milieu de culture (sources de carbone, azote et phosphate) et des paramètres physicochimiques.

##### **IV.5.1. Source de carbone**

La disponibilité et le type de la source de carbone influencent fortement le métabolisme secondaire et par conséquent la production d'antibiotique ou de mycotoxine (Martain et Demain, 1980; Doull et Vining, 1990; Spizec et Tichy, 1995). Les sources de carbone rapidement métabolisées tels que le glucose peuvent souvent permettre un taux de croissance cellulaire maximal, mais sont connues pour inhiber la production de nombreux métabolites secondaires. Cette répression catabolique semble être due à la charge

énergétique et à l'accumulation des intermédiaires du catabolisme du glucose. Chez certains microorganismes, l'effet inhibiteur du glucose sur la production des métabolites secondaires dépend du pH. L'acidification est provoquée par l'accumulation des acides organiques (Solé *et al.*, 2000).

Le glucose peut stimuler la production d'aflatoxines et de stérigmatocystine chez *Aspergillus* mais réprimer d'autres métabolites secondaires (Keller *et al.*, 1997). Les sucres comme le galactose, le xylose, le mannitol et le lactose (Kacholz et Demain, 1983) ne permettent pas une bonne production d'aflatoxines. Cependant Luchese et Harrigan (1999) suggèrent que le glucose n'est pas le facteur limitant pour la production d'aflatoxines chez *A. parasiticus*, pourvu que le champignon soit cultivé dans un milieu acide (pH de 4 à 5). L'augmentation de la concentration de sucrose de 2% à 32% dans le milieu de culture d'*A. ochraceus* entraîne une augmentation de la quantité de melleine produite (de 0,5 mg/l à 5,72 mg/l). Cependant la production spécifique (quantité de melleine/mg de mycélium) n'a pas de différence significative (Moore *et al.*, 1972). Les sources de carbone lentement assimilées tel que l'amidon (Basak et Majumdar, 1973) permettent de meilleurs rendements dans la production d'antibiotiques chez les champignons.

#### **IV.5.2. Source d'azote**

La source d'azote joue un rôle important dans la régulation des métabolites secondaires. Le choix de la source d'azote utilisée dans le milieu de croissance peut avoir des effets différents sur la production de stérigmatocystine et d'aflatoxines chez différentes espèces d'*Aspergillus*. Cependant les résultats sont parfois contradictoires entre les groupes de recherche. Ainsi l'utilisation de nitrate comme source d'azote réprime la production des intermédiaires de l'aflatoxines chez *A. parasiticus* (Kacholz et Demain, 1983; Niehaus et Jiang, 1989) mais favorise la production de stérigmatocystine chez *A. nidulans* (Feng et Leonard, 1998). Ces auteurs n'ont observé aucune production de stérigmatocystine dans les milieux contenant de l'ammonium. Certaines autres études indiquent que la production de stérigmatocystine et d'aflatoxines augmente dans les milieux à base d'ammonium et baissent dans le milieu à base de nitrate (Keller *et al.*, 1997; Morrice *et al.*, 1998). Chez *A. terreus*, les études ont montré que la biosynthèse de lovastatine dépend fortement de la

source d'azote. En effet, aucune production de ce métabolite n'est enregistrée lors de l'utilisation d'ammonium, nitrate ou urée dans le milieu de culture (Hajjaj *et al.*, 2001).

Les acides aminés peuvent avoir des effets stimulateurs sur les métabolites secondaires. Le glutamate est le fournisseur d'azote pour la biosynthèse de 85% des composés azotés de la cellule alors que la glutamine peut représenter la source de 15% des molécules azotées. Le glutamate et l'histidine favorisent la biosynthèse de lovastatine (Szakacs *et al.*, 1998; Manzoni *et al.*, 1999 ; Hajjaj *et al.*, 2001). L'influence des sources d'azote sur le métabolisme secondaire a été illustrée pour la biosynthèse de fumonisine B1 chez *Gibberella fujikuroi* (Shim et Woloshuk, 1999), de stérigmatocystine chez *A. nidulans* (Feng et Leonard, 1998), d'aflatoxines chez *A. parasiticus* (Luchese et Harrigan, 1993; Chang *et al.*, 1995) et de pénicilline chez *P. chrysogenum* (Feng *et al.*, 1994). D'après Ferreira (1967), l'acide glutamique (ou la proline) exerce un effet inducteur sur la biosynthèse d'OTA. Cependant, les autres acides aminés sont aussi connus pour être convertis en acide glutamique mais ils n'affectent pas la production de mycotoxine (Ferreira, 1968). De plus, la proline et l'acide glutamique stimulent la synthèse d'OTA chez *P. verrucosum* (Pitt, 1987).

#### **IV.5.3. Source de phosphate**

Bien que le phosphate soit essentiel pour la croissance, il peut, à certaines concentrations, affecter négativement le métabolisme secondaire. Dans certains cas, la synthèse du métabolite secondaire ne est déclenchée que si le milieu est carencé en phosphate (Weinberg, 1978 ; Larpent-Gourgaud et Sanglier, 1992). Il peut inhiber, par exemple, les phosphatases et les oxygénases (Spizek et Tichy, 1995 ; Larpent-Gourgaud et Sanglier, 1992). Le niveau d'adénosine triphosphate (ATP) chute fortement avant le démarrage du métabolisme secondaire (Cardova *et al.*, 1976). Le phosphate inorganique réprime la synthèse de la phosphatase, en augmentant le niveau d'ATP. Behal *et al.* (1979) ont montré que le phosphate réprime le métabolisme secondaire. La stimulation de la phase de croissance, par addition de phosphate, peut engendrer l'inhibition du métabolisme secondaire. Par contre la production de phénazine par *Pseudomonas phenazinium* ne semble pas être régulée par le niveau du phosphate (Messenger et Turner, 1983).

L'effet du phosphate sur la production d'un métabolite secondaire a été expliqué par plusieurs mécanismes (Martin, 1977) :

- Le phosphate favorise le métabolisme primaire et de ce fait inhibe le métabolisme secondaire.
- Le phosphate peut limiter la synthèse de certains inducteurs de la voie de biosynthétique des antibiotiques.
- Le phosphate inhibe la formation des précurseurs d'antibiotiques.
- Le phosphate inhibe ou réprime les phosphatases nécessaires pour la biosynthèse de certains antibiotiques.

#### **IV.5.4. pH**

Le pH contribue pour une part importante à la régulation de croissance et surtout à la production de métabolite secondaires par les microorganismes. La zone optimale de pH pour une synthèse optimale est généralement plus étroite que pour la croissance. En utilisant le milieu minimal, Keller *et al.* (1997) ont constaté que l'expression du gène *stcU* chez *A. nidulans* et son homologue *ver-1* chez *A. parasiticus* dans la production d'aflatoxines et de stérigmatocystine est affectée par le pH du milieu de culture. Ces gènes s'expriment plutôt et à un niveau élevé dans un milieu acide (pH de 4 à 6) par rapport au milieu neutre (pH 7) ou alcalin (pH 8). Le niveau de transcription est corrélé avec la production d'aflatoxines/stérigmatocystine. Chez *P. nordicum*, Geisen (2004) a trouvé que la production d'OTA ne paraît pas être influencée quand le pH du milieu varie entre 5 et 8. A pH 4, une chute de la quantité d'OTA a été observée. La cinétique d'expression du gène *otapksPN*, responsable de l'OTA a montré la même évolution que la quantité de toxine produite. Le pH entre 6 et 8 favorise l'expression de ce gène.

## **CHAPITRE II. Diversité des polycétones syntases chez *A. ochraceus* NRRL 3174**



## Chapitre II. Diversité des polycétones synthases chez *A. ochraceus* NRRL 3174

### Introduction

Les champignons filamenteux sont une source extraordinaire de polycétones. Malgré la diversité de leur structure chimique (dicétone, tétracétone, pentacétone, nonacétone, linéaire, cyclique, etc.), les polycétones synthases (PKS), enzymes permettant l'obtention d'un polycétone composé de différents sites catalytiques, possèdent certains domaines très conservés. Dans la course à la recherche de nouveaux médicaments et dans l'objectif de comprendre les voies de biosynthèses des mycotoxines, le nombre des PKS caractérisées augmente sans cesse. Plusieurs techniques sont utilisées pour cloner et caractériser de nouvelles PKS, comme par exemple: banque d'ADN génomique, banque d'ADNc, PCR soustractive (Bridge *et al.*, 1998).

Afin d'identifier de nouveaux gènes de PKS par PCR, des études ont été menées pour trouver des amorces ciblant des domaines conservés des PKS comme le domaine ketosynthase (KS), domaine le mieux conservé. Ainsi trois couples d'amorces dégénérées sont dessinés dans la littérature. Le couple d'amorces LC1/LC2c cible des domaines KS de PKS fongiques du groupe WA intervenant dans la biosynthèse de pigments, des aflatoxines (polycétones non réduits) ; le couple d'amorces LC3/LC5c cible des domaines KS de PKS du groupe MSAS intervenant dans la biosynthèse de patuline (polycétone partiellement réduit) (Bingle *et al.*, 1999 ; Nicholson *et al.* ; 2001), et le couple KS1/KS2 est utilisé pour cibler les domaines KS de PKS d'origines bactériennes et fongiques en général (Lee *et al.*, 2001 ; Liou et Khosla, 2003).

*A. ochraceus* est considéré comme producteur de plusieurs polycétones: ochratoxine A, melleine, hydroxymelleine, acide pénicillique. Cependant aucune étude sur la diversité des gènes de PKS de ce champignon n'a été réalisée. Dans cette partie, nous avons entrepris de démontrer la diversité des PKS présentes chez *A. ochraceus* NRRL 3174 en utilisant ces trois couples d'amorces dégénérées : LC1/LC2c, LC3/LC5c et KS1/KS2 (Tableau 4). L'étude phylogénétique nous a permis de prédire pour quel groupe de

polycétone les PKS obtenues chez *A. ochraceus* coderaient. Nous avons aussi entrepris de vérifier leur expression au cours du développement d'*A. ochraceus*.

**Tableau 4:** Séquences nucléotidiques des couples d'amorces utilisés pour amplifier les domaines KS chez *A. ochraceus* NRRL 3174 et étudier leur expression

Couple d'amorce	Séquence (5'-3')	Gène ciblé / Taille du produit de PCR
KS1 KS2	GGRTCNCIARYTGIGTICIGTICCRTG IG MGIGARGCIYTIGCIATGGAYCCICARC AR	Domaines KS des PKS bactériennes et fongiques / ~700 pb
LC1 LC2c	GAYCC NMGNT TYTT YAAYA TG GTNCC NGTNC CRTGC ATYTC	Domaines KS des PKS fongiques de type WA / ~700 pb
LC3 LC5c	GCNG ARC AR ATGGA YCCNC A GTNGA NGTNG CRTGN GCYTC	Domaines KS des PKS fongiques de type MSAS / ~700 pb
AoKS1L AoKS1R	ACGGTGAATGCCGCGTCGTAGT GCATCGTGATACCCATGCTGCG	<i>AoKS1</i> / 270 pb
AoKS9L AoKS9R	GGACGAGATCCAAGGCTCGCAG TGGGCACCCATGTGGAACAGA	<i>AoKS9</i> / 228 pb
AoKS11L AoKS11R	AAGGATCGTCGACCGGCGTGTA GCCGCCTCGTCCCACATATGAC	<i>AoKS11</i> / 355 pb
AoLC12-9L AoLC12-9R	GGCTTATGAAGCCATCGAAC GTCAGCCACTGCATCTTCAA	<i>AoLC12-9</i> / 475 pb
AoLC12-12L AoLC12-12R	GGAGGTGAATAGCGGTCAAA CATTGTCAGATAGGGCGTCA	<i>AoLC12-12</i> / 476 pb
AoLC12-14L AoLC12-14R	GGCCGGCTAAATTACCACTT CGTGCATCTCAACGTAATTCA	<i>AoLC12-14</i> / 519 pb
AoLC35-2L AoLC35-2R	CTGGAGGATCTCGCTGATGT TTTGATCGACCATTGTGTGC	<i>AoLC35-2</i> / 500 pb
AoLC35-6L AoLC35-6R	ACGTGGTCGCTTAAAGAGGA CGTCCTGGAAGACAAGGTGT	<i>AoLC35-6</i> / 400 pb
AoOTA-L AoOTA-R	CTGCCGCAACGCTCTATCTTTCCAATC CAATCACCCGAGGTCCAAGAGCCTCG	<i>AoLC35-12</i> / 520 pb
$\beta$ - TubF $\beta$ - TubR	CTCGAGCGTAGTAACGTCTAC AAACCTGGAGGCAGTCGC	<i><math>\beta</math>-tubuline</i> / 340 pb/ADN génomique (290 pb/ADNc)

(I : Inosine ; M : A/T ; R : A/G ; Y : C/T ; N : A/T/G/C)

## Résultats

### 1. Amplification et analyses phylogénétiques des domaines KS

L'amplification par PCR réalisée avec l'ADN génomique d'*A. ochraceus* NRRL 3174 a donné un produit d'environ 700 pb quelque soit le couple d'amorces dégénérées utilisé. Ces produits sont clonés puis séquencés. Les séquences obtenues sont traduites en acides aminés pour comparer avec des séquences disponibles dans les banques de données en utilisant le logiciel BLASTp (Altschul *et al.*, 1997). Les introns éventuels sont repérés manuellement puis retirés de la séquence nucléotidique lors de la traduction. L'existence des introns est vérifiée par séquençage des produits de PCR obtenus sur l'ADNc générés par un couple d'amorces couvrant la séquence d'intron.

Au total, neuf domaines KS différents sont identifiés chez *A. ochraceus* : AoKS1, AoKS9 et AoKS11 à partir de KS1/KS2 ; AoLC35-2, AoLC35-6 et AoLC35-12 à partir de LC3/LC5c et AoLC12-9, AoLC12-12 et AoLC12-14 à partir de LC1/LC2c (Tableau 5). Le motif conservé, caractéristique du domaine KS, **D(T/A)AC(S/A)SS**, est trouvé chez toutes les séquences. La comparaison de ces séquences avec celles disponibles dans la banque de données montre que ces domaines KS ont une forte identité avec d'autres PKS fongiques. Par exemple, les séquences AoKS1, AoKS11 et AoLC35-6 montrent environ 60% d'identité avec les domaines KS des nonacétones synthases d'*A. terreus* (LovB, N° d'accèsion de Genbank : AAD39830) et de *P. citrinum* (MlcA, N° BAC20564). Cette identité est de 50% pour AoLC35-12. La séquence AoKS9 donne 52% d'identité avec les dicétones synthases de *A. terreus* (LovF, N° AAD34559) et de *P. citrinum* (MlcB, N° BAC20566). La séquence AoLC35-2 a environ 65% d'identité avec les PKS du groupe MSAS telles que pksM d'*A. terreus* (N° AAC49814), MSAS de *P. griseofulvum* (N° CAA39295). Une identité supérieure a été obtenue pour les séquences amplifiées avec le couple d'amorces LC1/LC2c. Ainsi AoLC12-9 et AoLC12-12 ont montré de 80 jusqu'à 86% d'identité avec les PKS intervenant dans la synthèse de naphtopyrones chez *A. terreus* et *A. nidulans*. AoLC12-14 est plutôt similaire avec les PKS conduisant à la synthèse de mélanine (de 60 à 63% d'identité) chez *C. lagenarium* et *M. purpureus*.

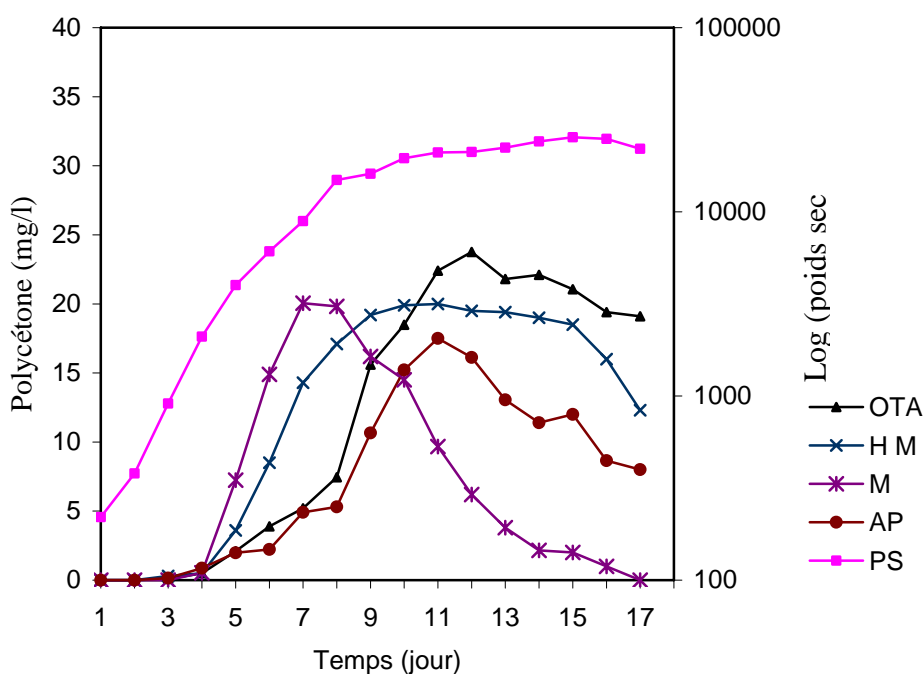
**Tableau 5** : Pourcentage d'identité des séquences protéiques correspondant aux domaines KS amplifiés chez *A. ochraceus* NRRL 3174 par PCR avec les trois couples d'amorces dégénérées KS1/KS2, LC3/LC5c et LC1/LC2c.

Nom des séquences	Taille	Intron	% d'identité (Blastp)
<i>AoKS1</i>	705 pb	Non	50-60% avec lovB d' <i>A. terreus</i> et mlcA de <i>P. citrinum</i> (nonacétones synthases, polycétones réduits)
<i>AoKS11</i>	720 pb	Non	
<i>AoLC35-6</i>	705 pb	Non	
<i>AoLC35-12</i>	820 pb	66 pb	
<i>AoKS9</i>	700 pb	60 pb	48-50% avec lovF d' <i>A. terreus</i> et mlcB de <i>P. citrinum</i> (dicétones synthases, polycétones réduits)
<i>AoLC35-2</i>	680 pb	Non	60-68% avec les PKS du groupe MSAS (polycétone partiellement réduit)
<i>AoLC12-9</i>	722 pb	Non	80-86% avec les PKS de naphtopyrone ( <i>A. nidulans</i> ), de pigment de spore ( <i>A. terreus</i> ) (polycétones non réduits).
<i>AoLC12-12</i>	825 pb	54 pb ; 48 pb	
<i>AoLC12-14</i>	776 pb	50 pb	60-63% avec des PKS de la mélanine chez <i>C. lagenarium</i> et <i>M. purpureus</i> (polycétones non réduits)

Ainsi, l'analyse phylogénétique des séquences amplifiées par les trois couples d'amorces chez *A. ochraceus* montre que ces PKS interviendraient dans la biosynthèse des polycétones appartenant au trois grands groupes chimiques: AoKS1, AoKS9, AoKS11, AoLC35-6, AoLC35-12 seraient impliqués dans la synthèse des polycétones réduits comme lovastatine, compactine, toxine T; AoLC35-2 serait impliqué dans la synthèse des polycétones partiellement réduits comme patuline; et AoLC12-9, AoLC12-12, AoLC12-14 seraient impliqués dans la synthèse des polycétones non réduits comme mélanine, naphtopyrone (Kroken *et al.*, 2003).

## 2. Production des polycétone chez *A. ochraceus* NRRL 3174

La cinétique de croissance d'*A. ochraceus* NRRL 3174 sur un milieu synthétique liquide statique (Awad *et al.*, 2005) à 25°C et pendant 17 jours montre deux phases de croissance. Tout d'abord, *A. ochraceus* se développe activement jusqu'au 8<sup>ème</sup> jour d'incubation et ensuite on note un ralentissement de sa croissance jusqu'au 15<sup>ème</sup> jour d'incubation (Fig. 13). Une faible chute de la biomasse est constatée jusqu'au 17<sup>ème</sup> jour.



**Fig. 13.** Cinétique de croissance et de production des polycétone d'*A. ochraceus* NRRL 3174. (OTA : ochratoxine A, H M : hydroxymelleine, M : melleine, AP : acide pénicillique, PS : poids sec).

**Tableau 6 :** Caractéristiques spectrales des polycétones pour leur identification chez *A. ochraceus* par HPLC

Métabolite	Temps de rétention	Maximum d'absorption
Patuline	3min40s	276 nm
Isoasperlactone	5min30s	220 nm
Asperlactone	7min30s	220 nm
Acide pénicillique	10min50s	227 nm
Acide orsellinique	12min	215 ; 260 et 305 nm
Melleine	15min	214 ; 245 et 314 nm
Viomelleine	16min	228 ; 275 ; 360 ; 380 ; 415 nm
Hydroxymelleine	25min	214 ; 245 et 314 nm
Ochratoxine A	33min	216 ; 250 et 332 nm
Xanthomegnine	36min	232 ; 288 ; 403 nm

La production de certains polycétones chez *A. ochraceus* a été suivie au cours de sa croissance par HPLC. Nous nous sommes intéressés particulièrement aux polycétones/mycotoxines tels que OTA, melleine, hydroxymelleine, et acide pénicillique. Le même programme d'HPCL a été utilisé dans la détection des polycétones. L'identification des métabolites a été réalisée grâce à la comparaison, avec des standards, du temps de rétention, du maximum d'absorption du spectre UV et/ou de la fluorescence (Tableau 6). Parmi les métabolites suivis, la melleine paraît se différencier des autres (Fig.13). Elle a été détectée dans le milieu de culture à partir du 4<sup>ème</sup> jour puis rapidement produite en quantité importante. Cependant sa biosynthèse semble être transitoire. Elle atteint son maximum au bout de 7 jours puis disparaît doucement pour s'annuler au 17<sup>ème</sup> jour. Cette chute progressive est probablement due à la conversion de melleine en hydroxymelleine et OTA.

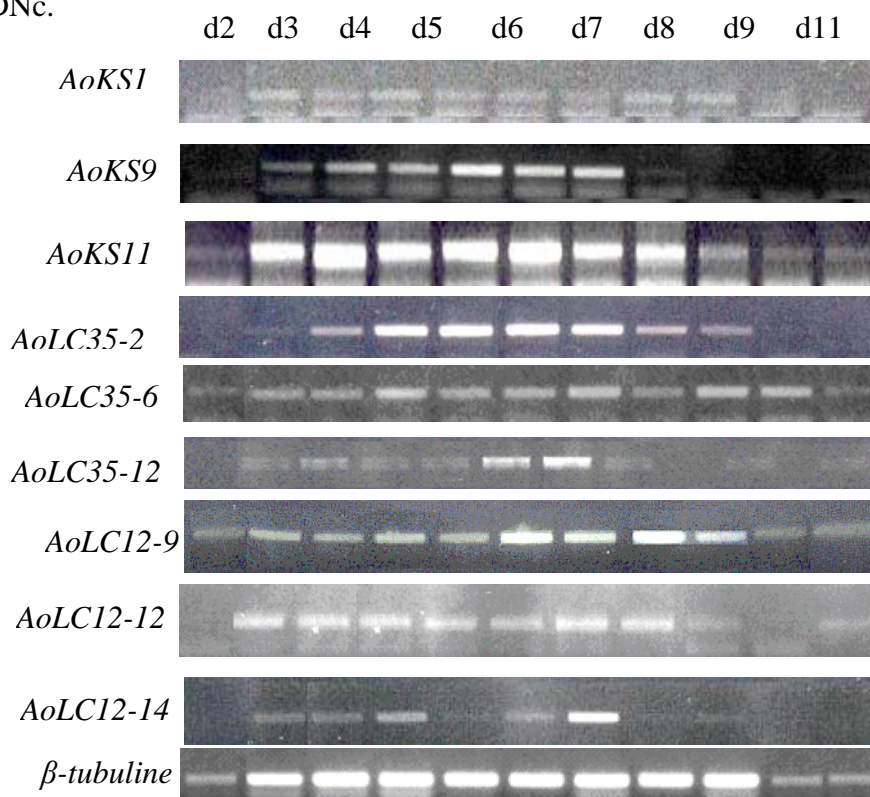
La production d'hydroxymelleine se fait en parallèle à celle de melleine, jusqu'au 8<sup>ème</sup> jour. Elle atteint son maximum au bout de 9 jours d'incubation puis reste stable jusqu'au 15<sup>ème</sup> jour. La biosynthèse d'ochratoxine A se fait d'une façon lente au cours de la première phase de croissance. Elle s'active au cours de la seconde phase de croissance

durant laquelle la melleine disparaît, pour atteindre son maximum au 12<sup>ème</sup> jour. La biosynthèse d'acide pénicillique suit le même type d'évolution que celle d'OTA.

Durant la croissance d'*A. ochraceus*, nous avons également détecté l'apparition transitoire de l'acide orsellinique au 8<sup>ème</sup> jour d'incubation seulement. Les productions d'asperlactone, d'isoasperlactone, de viomelleine, de xanthomégine et de patuline est aussi enregistrée.

### 3. Expression des gènes *pks*

L'expression des gènes *pks* obtenus chez *A. ochraceus* NRRL 3174 est évaluée par RT-PCR (Fig. 14). Le gène de  $\beta$ -tubuline est utilisé comme contrôle positif de la transcription et de la contamination d'ADN génomique. En effet, l'amplification de ce gène avec les amorces choisies donne 340 pb sur l'ADN génomique (avec un intron) et 290 pb sur l'ADNc.



**Fig. 14.** Expression des gènes *pks* chez *A. ochraceus* NRRL 3174

Dans nos conditions de culture, tous les gènes *pks* concernés sont exprimés. A l'exception de *AoKS11*, *AoLC35-6* et *AoLC12-9* qui sont exprimés dès le deuxième jour de croissance, les autres gènes commencent à s'exprimer seulement à partir du troisième jour. L'expression de ces gènes paraît atteindre un niveau maximal pendant la phase active de croissance. Cependant le niveau d'expression est différent d'un gène à l'autre. Au 13<sup>ème</sup> jour de croissance, mis à part *AoKS11*, *AoLC35-6*, *AoLC12-9* et *AoLC12-12*, tous les autres gènes ne sont plus exprimés.

## Discussion

En utilisant les trois couples d'amorces dégénérées cités dans la littérature, nous avons réussi à amplifier et séquencer 9 différents domaines KS révélant l'existence d'au moins 9 gènes *pks* différents chez *A. ochraceus* NRRL 3174. Il reste sans doute d'autres gènes *pks* non révélés dans nos conditions. En effet, en utilisant le même couple d'amorces LC1/LC2c, Varga *et al.* (2003) ont montré chez *A. ochraceus* NRRL 3174 un autre gène *pks* différent des nôtres. Ce dernier coderait pour des naphthopyrones (polycétones non réduits) tel que le prédit l'analyse phylogénétique. Ces auteurs ont réalisé les mêmes démarches sur une souche d'*A. ochraceus* O4 isolée à partir du café, et ils ont identifié une PKS à 90% identique à la PKS précédente. D'autres auteurs ont également révélé l'existence de deux autres gènes *pks* (*AoKSJ1* et *AoKS-7*) chez *A. ochraceus* HP99 (Edwards *et al.* 2002). La séquence en acides aminés de *AoKS7* montre environ 50% d'identité avec les nonacétones ou dicétones synthases d'*A. terreus* et *P. citrinum* tandis que celle de *AoKSJ1* montre jusqu'à 96% d'identité avec *pksL2*, responsable de la production d'acide 6-methylsalicylique (MSA) chez *A. parasiticus* (Edwards *et al.*, 2002). Ceci n'est guère surprenant quand on voit la diversité de molécules de nature polycétone que *A. ochraceus* est capable de produire dans nos conditions de culture. Parmi ces différentes molécules on peut citer l'acide pénicillique, aspyrone, asperlactone, melleine, ochratoxine, emodine, xanthomegnine, viomelleine ainsi que des naphthopyrones et des pigments (Abrell *et al.*, 1996; Bode *et al.*, 2002; Durley *et al.*, 1975; Fuchser et Zeeck, 1997; Harris et Mantle, 2001; Turner *et al.*, 1983). De plus, une étude récente menée par



Awad *et al.* (2005) montre clairement que cette espèce est capable de produire d'autres molécules polycétones dès lors que certaines modifications sont réalisées tel que le changement de milieu de culture ou des mutations obtenues suite à une exposition des spores aux UV.

L'analyse phylogénétique des PKS d'*A. ochraceus* NRRL 3174 a permis de prédire leur rôle général. Cette approche est possible car les résultats sont bien étayés par les taux d'identités obtenues par Blastp avec les PKS disponibles dans les banques de données (Tableau 5). Les 9 PKS obtenues dans notre étude sont distribuées dans les trois principaux groupes de PKS connus chez les champignons. AoKS1, AoKS9, AoKS11, AoLC35-6 et AoLC35-12 font partie des PKS responsables de la biosynthèses des polycétones réduits tels que les polycétones aromatiques : OTA, melleine, compactine ou des polycétones linéaires comme toxine T (Kroken *et al.*, 2003). AoLC35-2 se trouve parmi les PKS impliquées dans la biosynthèse de MSA et des produits dérivés. Ce sont des métabolites partiellement réduits. Enfin, AoLC12-9, AoLC12-12 et AoLC12-14 sont classées avec des PKS catalysant la synthèse des polycétones non réduits comme la mélanine, les naphtopyrones et les aflatoxines (Kroken *et al.*, 2003, Varga *et al.*, 2003).

Dans nos conditions de culture, *A. ochraceus* NRRL 3174 présente deux phases de croissance active. Les métabolites suivis au cours de cette culture se répartissent en deux catégories. Ceux qui sont majoritairement produits pendant la première phase de croissance (melleine) et ceux qui sont produits pendant la seconde phase (OTA, acide pénicillique et hydroxymelleine). Cependant il n'y a pas une séparation franche entre la phase de croissance et la phase de production de différents polycétones comme c'est le cas de la majeure partie des métabolites secondaires. Cependant il faut rappeler que la culture en milieu liquide d'*A. ochraceus* a été réalisée en situation non agitée. Dans ces conditions, le champignon se développe comme sur un support solide aboutissant rapidement à une différenciation morphologique (apparition d'un mycélium aérien au bout de 2 jours et d'une première sporulation au bout de 3 jours). Ceci expliquerait l'association de l'augmentation du poids sec et la production des polycétones. Plusieurs études ont montré que la production des métabolites secondaires (mycotoxines, pigments) chez les champignons est associée à la différenciation morphologique comme l'apparition du mycélium et la

sporulation (Guzman-de-Pena *et al.*, 1997 ; Langfelder *et al.*, 1998 ; Tsai *et al.*, 1998 ; Keller *et al.*, 2002).

Dans nos conditions de culture, certains intermédiaires des voies de biosynthèse peuvent s'accumuler transitoirement. C'est le cas de l'acide orsellinique (intermédiaire connu dans la voie de biosynthèse d'acide pénicillique), détecté uniquement au 8<sup>ème</sup> jour de culture. C'est également le cas de la melleine (intermédiaire probable de la biosynthèse d'OTA) dont la cinétique est cependant bien différente de celle d'acide orsellinique. En effet sa production est transitoire mais sur plusieurs jours. Son apparition est observée à partir du 5<sup>ème</sup> jour et jusqu'au 8<sup>ème</sup> jour de culture, pour diminuer régulièrement jusqu'au 17<sup>ème</sup> jour d'incubation. Sa disparition est presque séquentielle par rapport à la biosynthèse d'OTA. Cependant, l'analyse des gènes reste nécessaire pour confirmer définitivement le rôle de melleine dans la biosynthèse d'OTA.

Dans nos conditions de culture, les 9 gènes *pks* révélés chez *A. ochraceus* NRRL 3174 sont capables de s'exprimer. Cette expression se fait pendant la phase de production des métabolites mentionnés ci-dessus. Ces gènes *pks* pourraient jouer donc un rôle essentiel dans la biosynthèse de ces métabolites. Ceci doit être vérifié par rupture de chacun des gènes afin de montrer sans aucune ambiguïté dans quelle biosynthèse intervient chaque gène *pks*. Ceci sera discuté par la suite et plus particulièrement les séquences *AoLC35-2* et *AoLC35-12*

## **Article 1:**

( Sousmise à Research in Microbiology)

### **Amplification and analysis of ketosynthase domains of putative polyketide synthase genes in *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174**

Dao Huy Phong, Mathieu Florence and Lebrihi Ahmed\*

Département « Bioprocédés et Systèmes Microbiens », Laboratoire de Génie Chimique UMR5503 (CNRS/INPT/UPS), Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse, Institut National Polytechnique de Toulouse, 1, avenue de l'Agrobiopôle, BP32607, 31326 Castanet Tolosan, France.

\* Corresponding author

Tel: 00 33 (0)5 62 19 39 44

Fax: 00 33 (0)5 62 19 39 01

E-mail: [lebrihi@ensat.fr](mailto:lebrihi@ensat.fr)

## **Abstract**

*Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 produce a wide array of secondary metabolites via the polyketide synthase (PKS) pathway: ochratoxin A, mellein, hydroxymellein, penicillic acid and asperlactone. To investigate the diversity of *PKS* genes in this microfungus, three degenerated primer pairs previously designed to amplify the ketosynthase (KS) domains of PKSs were used by PCR on genomic DNA. Nine different KS of about 250 amino acids were obtained: AoKS1, AoKS9 and AoKS11 from primer pair KS1/KS2; AoLC35-12, AoLC35-2 and AoLC35-6 from LC3/LC5c; AoLC12-9, AoLC12-12 and AoLC12-14 from LC1/LC2c. Phylogenetic analysis of these sequences showed that polyketide synthases in *A. ochraceus* NRRL 3174 are distributed in all major clades: highly reduced, partially reduced and non reduced PKSs.

**Keywords:** *Aspergillus ochraceus*, polyketide synthase, PKS, ochratoxin A, penicillic acid

## 1. Introduction

Microfungi are a rich source of many polyketides, secondary metabolites that are derived from the successive condensation of small carboxylic acids and catalyzed by enzymes known as polyketide synthases (PKSs) in a process closely analogous to fatty acid biosynthesis (Nicholson *et al.*, 2001). Many of these low molecular weight compounds are useful in agriculture and pharmacology (e.g. compactin (Abe *et al.*, 2002), lovastatin (Hendrickson *et al.*, 1999)) but a lot of them are harmful such as mycotoxins (e.g. aflatoxin (Dragan *et al.*, 1994), ochratoxin A (Van der Merwe *et al.*, 1965), patulin (Gaucher, 1979), and penicillic acid (Sekiguchi *et al.*, 1987)).

Fungal type I PKSs, multifunctional enzymes, are highly variable in structure and might be divided into two subclasses known as WA-type, which are involved in the pigment and aflatoxin biosynthesis pathway, and 6-methylsalicylic acid synthase (MSAS) type, which are involved in biosynthesis of patulin and related compounds (Bingle *et al.*, 1999). Type I PKS contains three core domains: the ketosynthase (KS), the most highly conserved domain, which catalyzes chain elongation; the acyl carrier protein (ACP), which provides a flexible thiol-containing arm onto which biosynthetic intermediates are appended; and the acyl transferase (AT), which transfers building blocks from acyl-CoA precursors to the ACP (Lee *et al.*, 2001). These PKSs use iteratively their active sites during assembly of the polyketide from acetate and malonate, and determine the level of reduction and dehydration of each state as well as the length of carbon chain. Based on the conservation of KS domain, several degenerated primer pairs were designed in order to facilitate the cloning of novel *PKS* genes (e.g. KS1/KS2 for bacterial and fungal PKSs (Liou and Khosla, 2003), LC1/LC2c for PKSs of WA-type, and LC3/LC5c for PKSs of MSAS-type) (Bingle *et al.*, 1999; Nicholson *et al.*, 2001).

*Aspergillus ochraceus* is used for bioconversion of steroids and alkaloids (Chen *et al.*, 1994; Petroski *et al.*, 1983) or for enzyme production (Charda and Garcha, 1992), but it is known to contaminate products of plants, coffee beans, barley (Fazekas *et al.*, 2002), and to produce more than 20 different polyketides (ochratoxin A and analogues, aspyrone derivatives, diaporthin, orthosporin, xanthomegnin, mellein derivatives, aspinonene, aspindoles, triendiol, decanolides, chlorocarolides) (Varga *et al.*, 2003). Ochratoxin A

(OTA), due to its nephrotoxic, immunosuppressive, teratogenic, carcinogenic properties, constitutes one of the major sources of preharvest and postharvest contamination in human and animal food (O'Callaghan *et al.*, 2003).

Up to now, five *PKS* genes were identified in *A. ochraceus*, four KS domain sequences (Edwards *et al.*, 2002; Varga *et al.*, 2003) and one AT domain sequence (O'Callaghan *et al.*, 2003). However, only the gene corresponding to AT domain was known to be involved in the ochratoxin A biosynthesis (O'Callaghan *et al.*, 2003).

In present study, in order to investigate the diversity of *PKS* genes in *A. ochraceus* NRRL 3174, we used a PCR approach including three sets of degenerated primers targeting the KS domains. Obtained KS domain sequences were subjected to phylogenetic analysis to predict their functional role. Kinetic expression of *AoLC35-2* sequence, which was thought to be involved in penicillic acid biosynthesis, was performed.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Fungal culture conditions**

*A. ochraceus* NRRL 3174 was grown for sporulation at 25°C on potato dextrose agar (Difco, Fisher Labosi) for 7 days. Spores were collected using a solution of 0.01% (v/v) Tween 80 (Fisher Labosi), and stored at -20°C in 25% (v/v) glycerol (Fisher Labosi) before use. Conidia were inoculated (density ~ 10<sup>6</sup>/ml) into 250-ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml of synthetic medium (SAM) at 25°C, without shaking. The composition of SAM (per liter of distilled water) was: 3 g NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (Acros), 26 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Acros), 1 g KCl (Acros), 1 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (Acros), 10 ml mineral solution (of the following composition , per liter of distilled water: 70 mg Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>.10H<sub>2</sub>O (Sigma), 50 mg (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O (Sigma), 1000 mg FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (Riedel-de Haën), 30 mg CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (Prolabo), 11 mg MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (Prolabo), 1760 mg ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (Fisher Labosi), and the pH was adjusted to 2 with 2 N HCl), and 50 g glucose (Fisher Labosi). The pH of the medium was adjusted to 6.5 by 2 N HCl. Samples were removed every day during 17 days consecutive. Mycelium was harvested by filtration through a 0.45µm filter (Millipore) frozen in liquid nitrogen and then stored in -80°C before nucleic acid extraction. Filtered

medium was used to extract secondary metabolites. For dry weight determination, mycelium was dried overnight in oven at 100°C.

## 2.2. Extraction of penicillic acid and HPLC analysis

30ml filtrate samples were acidified with 200 µl of 12 N HCl, mixed with 20 ml chloroform and vigorously shaken for 10 min. The solvent was then decanted, dried under vacuum and redissolved in 0.5 ml methanol. 20 µl of the sample was then further analysed by HPLC. The residue was dissolved in methanol (0.5 ml) and 20 µl was used to detect penicillic acid by reversed-phase HPLC as described by Awad *et al.* (2005). Penicillic acid was eluted after 10min50sec, and was confirmed by spectral comparison at UV 227 nm with penicillic acid standard.

## 2.4. Nucleic acids extraction

Genomic DNA was extracted by using lysing enzyme and proteinase K as previously described (Dao *et al.*, 2005). Total RNA was extracted from *A. ochraceus* NRRL 3174 using the Tri-reagent (Euromedex) which included the following steps: 200 mg of mycelia was homogenized in 1 ml of Tri reagent by using a Ultra-Turax. After 5 min at room temperature, 0.2 ml of chloroform was added to the homogenized samples, vigorously vortexed, stored for 10 min at room temperature and then centrifuged at 15000 x g for 15 min at 4°C. The aqueous phase containing RNA was transferred into a microcentrifuge tube and 0.5 ml isopropanol (Euromedex) was added for RNA precipitation at room temperature (15 min). The RNA was pelleted by centrifuging at 12000 x g at 4°C for 15 min, washed with 1 ml of 75% ethanol then air-dried and dissolved in 50 µl of 0.1% Diethylpyrocarbonate (DEPC) (Sigma) water. The quality and quantity of RNA was checked by the  $DO_{260/280}$  ratio and agarose (Fisher Labosi) gel electrophoresis according to standard protocols (Sambrook *et al.*, 1989).

## 2.4. RT-PCR reaction

Total RNA was treated with DNase I (Promega) to remove DNA contamination. cDNA was synthesized from each sample with Advantage RT-for-PCR Kit (BD Biosciences) according to the user manual provided.

PCR was performed with the *Taq* recombinant polymerase (Invitrogen, USA). Amplification was carried out in a 50 µl reaction mixture containing: 5 µl of *Taq* polymerase 10X buffer, 1,5 µl of 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µl of dNTP 10 mM of each (Promega), 1 µM of each primer, 1.5 U of *Taq*, about 200 ng of DNA genomic, H<sub>2</sub>O up to 50 µl. Reaction conditions were: 94°C for 4 min, (94°C for 45 sec, 53°C for 45 sec and 72°C for 1 min) x 30 cycles followed by an incubation at 72°C for 10 min. The amplified products were examined by 1% (w/v) agarose (Promega) gel. The PCR products were cloned into pCR2.1-TOPO vector (Invitrogen) according to the supplier's instructions. Sequencing of the fragments was performed by Genomexpress (Grenoble, France)

## 2.5. Data analysis

The deduced amino acid sequence was determined using the <http://www.expasy.org/tools/dna.html> site while protein-protein Blast (Blastp) searches were conducted at the GenBank database: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. The alignments were conducted using the website <http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>. The presence of intron in DNA sequence was predicted that contains the canonical GT and AG dinucleotides at its 5'- and 3'-splicing junctions. For the phylogenetic tree construction, 125 amino acids of our 9 different identified KS domains from *A. ochraceus* NRRL 3174 and those found by Blastp research were analyzed using the ClustalX package version 1.83 (Thompson *et al.*, 1997) and Mega2 package (Kumar *et al.*, 2001). Unroot consensus tree was generated using neighbor-joining method.

## 2.6. Sequence accession number

Nine nucleotide sequences have been deposited in the GenBank database with the accession numbers provided in the Table 1.

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Amplification of ketosynthase domains

Using three different degenerated primer pairs based on the conserved ketosynthase domains: KS1/KS2 (Liou *et al.*, 2003), LC1/LC2c and LC3/LC5c (Bingle *et al.*, 1999; Nicholson *et al.*, 2001), we identified nine different KS domain sequences of about 700 pb in *A. ochraceus* NRRL 3174 (Table 1). The predicted amino acid sequences were aligned with two other KS domain sequences available in the Genbank, one from *A. ochraceus* NRRL 3174 (Accession N° AY320069), and the other one from *A. ochraceus* O4 (Accession N° AY320070), previously identified by Varga *et al.* (2003) (Fig. 1). Consensus sequence showed that all aligned sequences were different. The conserved pattern D(T/A)AC(S/A)SS characteristic of the KS domain was displayed in each sequence. Alignment could not use the two other KS domain sequences, AoKS-7 and AoksJ1, identified by Edwards *et al.* in *A. ochraceus* NRRL 3174 because only about 30 amino acids were published (Edwards *et al.*, 2002).

With the primer pair KS1/KS2 targeting fungal and bacterial KS domains, three different sequences: *AoKS1*, *AoKS9* and *AoKS11* were identified (Table 1 and Fig. 1). By Blastp analysis, both *AoKS1* and *AoKS11* amino acid sequences displayed about 60 % identity to nonaketide synthases involving either in the lovastatin biosynthesis (LovB) in *A. terreus* (Hendrickson *et al.*, 1999), or in the compactin (ML-236B) biosynthesis (MlcA) in *P. citrinum* (Abe *et al.*, 2002). *AoKS1* sequence was closely similar to the *AoKS-7* sequence identified in *A. ochraceus* NRRL 3174 by Edwards *et al.* (2002) with only two different amino acids on 33 compared (data not shown) suggesting that they have a same function. The third sequence, *AoKS9*, carrying an intron of 65 bp, was mostly related (52 % identity), respectively, to the diketide synthase LovF from *A. terreus*, and MlcB from *P. citrinum*. These diketide synthase genes were involved in the biosynthesis of lovastatin (Hendrickson *et al.*, 1999) or compactin (Abe *et al.*, 2002), and did not contain any intron in their KS domains.

Using the primer pair LC3/LC5c targeted MSAS-type PKSs, three different KS sequences were amplified and sequenced (Table 1 and Fig. 1). *AoLC35-12* was found to



carry an intron of 66 bp while *AoLC35-2* and *AoLC35-6* contained none. *AoLC35-2* amino acid sequence was firstly related to MSAS (68% identity), a PKS involved in the 6-methylsalicylic acid synthesis in *Byssoschlamys nivea* (Genbank N°AAK48943), and secondly (60 % identity) to the MSAS encoded by *pksM* of *A. terreus* (Pazoutova *et al.*, 1997). The comparison of *AoLC35-2* with 30 amino acids of AoksJ1 from *A. ochraceus* NRRL 3174, identified by Edwards *et al.* (2002), showed 7 different amino acids indicating that these sequences were quite different. *AoLC35-6* showed 63% identity with the nonaketide synthases involved in the biosynthesis of lovastatin in *A. terreus* or compactin in *P. citrinum*. However this sequence is absolutely different from AoKS11 and AoKS1. *AoLC35-12* displayed about 42% identity to the diketide synthases in *A. terreus* (*lovF*) or *P. citrinum* (*mlcB*). Sequencing of the AT domain corresponding to *AoLC35-12* gene (data not shown) showed that this PKS overlap the acyl-transferase domain sequence (*aopks*, Genbank N° AY272043) which was demonstrated to be involved in OTA biosynthesis by using gene disruption technique from *A. ochraceus* HP99 (O'Callaghan *et al.*, 2003).

With the pair LC1/LC2c amplifying non-reduced or WA-type PKSs (Bingle *et al.*, 1999; Nicholson *et al.*, 2001), three different KS sequences were obtained, *AoLC12-9*, *AoLC12-12*, and *AoLC12-14* (Fig. 1). *AoLC12-12* DNA sequence was found to carry two introns of 54 bp and 48 bp. *AoLC12-14* contained one of 50 bp and *AoLC12-9* none. Blastp analysis showed, for *AoLC12-9*, 86 % identity to amino acid sequences encoded by *pks3* (function unknown) from *Gibberella fujikuroi* and *G. moniliformis* (Kroken *et al.*, 2003), and for *AoLC12-12*, 80 % identity to *at4* in *A. terreus* that was required in naphthopyrone biosynthesis (Genbank N° BAB88689). Using the same set of primers for *A. ochraceus* NRRL 3174, Varga *et al.* (2003) amplified a putative PKS highly similar to *AoLC12-12* (92% identity). *AoLC12-14* exhibited a high identity (60%) to PKSs involved in melanin biosynthesis in *Nodulisporium* sp (Fulton *et al.*, 1999) and in *Colletotrichum lagenarium* (Takano *et al.*, 1995).

Fungi are an enormous source of polyketide metabolites. Until 20 PKSs in *A. nidulans*, 25 in *Cochlicobolus heterostrophus* and 16 in *G. zae* were identified by bioinformatics methods (Kroken *et al.*, 2004; Varga *et al.*, 2003). *A. ochraceus* could produce more than 20 different polyketides, however, 14 PKSs were identified so far by

PCR and sequencing method. Using degenerated primer, we could not probably amplify all KS domains in the genome of *A. ochraceus* NRRL 3174.

### 3.2. Clustering of putative PKSs identified

All identified KS domain sequences from *A. ochraceus* NRRL 3174 in this study and other fungal PKSs found by Blastp from database were analyzed using phylogenetic approach (Fig. 2). Our sequences were distributed in three main clades as previously defined by several authors (Kroken *et al.*, 2003; Nicholson *et al.*, 2001), highly reduced PKSs (AoKS1, AoKS11, AoKS9, AoLC35-6 and AoLC35-12), partially reduced PKSs (AoLC35-2) and non-reduced PKSs (AoLC12-9, AoLC12-12 and AoLC12-14) (Fig. 2).

In the highly reduced clade, AoKS1, AoKS11 and AoLC35-6 were found to be closely related to nonaketide synthases while AoKS9 and AoLC35-12 were with diketide synthases. They formed a lovastatin/T-toxin cluster (Bingle *et al.*, 1999; Kroken *et al.*, 2003; Varga *et al.*, 2003). AoKS9 and AoLC35-12 were both positioned with PKSs of diketide synthases but their bootstrap value was significant (<50). Thus, it is probably due to the fact that these sequences were required for the biosynthesis of another polyketide than diketide. For example, in *A. ochraceus*, AoLC35-12 was responsible for the production of OTA, a pentaketide (O'Callaghan *et al.*, 2003).

In the partially reduced clade, we found only one sequence of *A. ochraceus* NRRL 3174, AoLC35-2, which was highly closed to PKSs of fungal MSAS, and to orsellinic acid synthase in *Streptomyces viridochromogenes* (Gaisser *et al.*, 1997) (Fig. 2). At molecular level, bacterial orsellinic synthase gene was well clustered to fungal MSAS gene but shorter due to the absence of ketoreductase domain, KR. Orsellinic acid and MSA chemical structures were very similar. Both were described as tetraketide compounds of several important polyketide pathways. In *P. cyclopium*, orsellinic was found to be the precursor of penicillic acid biosynthesis pathway (Sekiguchi *et al.*, 1987). In *P. patulum* and related species, MSA served as the precursor of patulin (Bu'Lock and Ryan, 1958). Recent study in *P. nordicum*, Geisen *et al.* (2004) identified a PKS MSAS-type which involved in the production of ochratoxin A, a pentaketide. In *A. ochraceus*, neither MSAS nor orsellinic synthase gene was characterized. Thus, kinetic study of penicillic acid

production and expression of *AoLC35-2* sequence were performed during the growth of *A. ochraceus* (Fig. 3). No MSA was detected in the culture but the transitory presence, and at low quantity of orsellinic acid at day 8 only (data not shown). Expression of *AoLC35-2* sequence started at day 3, peaked at day 8 then stopped after day 11. It seems to be coherent with penicillic acid production which started at day 3, reached the maximum at day 11. These results suggest a link between the function of *AoLC35-2* gene and penicillic acid metabolite produced in *A. ochraceus*. However, further work must be done to fully understand this gene.

All sequences from LC1/LC2 fall into the non reduced clade (Fig 2). *AoLC12-14* was closed to PKSs in melanin cluster but formed a separate branch suggesting a different function. *AoLC12-12* was found in naphthopyrone cluster with two other sequences of *A. ochraceus* NRRL 3174 and *A. ochraceus* O4, while *AoLC12-9* was in the cluster of PKSs responsible for spore pigment (Fig. 2). *AoLC12-9* was closely clustered (bootstrap value = 100) with *G. moniliformis* pks3 and *G. fujikuroi* pks3, two orthologous genes. They encoded potentially enzymes of identical or nearly identical biochemical function. In *Aspergillus* species, Varga *et al.* (2003) showed the presence of at least 7 different clusters corresponding to the metabolites produced by these PKSs (MSAS, lovastatin/T-toxin, fumonisins, aflatoxins, naphthopyrones, pigments, melanins). *A. ochraceus* NRRL 3174 was not known to produce fumonisins and aflatoxins. This could explain the absence of fumonisins and aflatoxins clusters in our phylogenetic tree.

Kroken *et al.* (2003) suggested from KS-domain genealogy that the ancestral domain structure of type I PKSs fungal PKSs was KS-AT-DH (dehydratase)-ME (methyltransferase)-ER (enoyl reductase)-KR (ketoreductase)-ACP. The diversity of fungal PKSs was due to the loss or gain of one of the DH, ER and KR which were determine the reduction level of polyketide produced, and ME domain, or the presence of more than one ACP domain. For example, the lovastatin diketide contained ER domain but the nonaketide did not.

## Conclusion

Using PCR approach with three degenerated primer pairs, nine different putative PKSs in *A. ochraceus* NRRL 3174 were obtained in this study. Blastp and phylogenetic analysis results showed a high diversity of polyketide synthase genes, and suggested the presence of many active polyketide synthases in this fungus. The primer set KS1/KS2 amplified highly reduced PKSs which are closely related to nonaketide (AoKS1 and AoKS11) or diketide PKSs (AoKS9). The LC3/LC5c targeted not only partially (AoLC35-2) but also highly reduced PKSs (AoLC35-6 and AoLC35-12). AoLC35-6 sequence, like AoKS1 and AoKS11, were closely related to nonaketide synthases while AoLC35-12 sequence, like AoKS9, showed similar to diketide synthases. Furthermore, two sequences AoKS1 and AoKS11 (obtained from KS1/KS2) were re-amplified by LC3/LC5c. With LC1/LC2c primer pair, all KS sequences identified were WA-type PKSs, closely related to PKSs involved in melanin or naphthopyrones biosynthesis.

## References

- Abe, Y., T. Suzuki, C. Ono, K. Iwamoto, M. Hosobuchi, and H. Yoshikawa. 2002. Molecular cloning and characterization of an ML-236B (compactin) biosynthetic gene cluster in *Penicillium citrinum*. *Mol. Genet. Genomics*. 267: 636-646.
- Awad, G., F. Mathieu, Y. Coppel, and A. Lebrihi. 2005. Characterization and regulation of new secondary metabolites from *Aspergillus ochraceus* M18 obtained by UV mutagenesis. *Can. J. of Microbiol.* 51(1): 59-67.
- Bingle, L. E., T. J. Simpson, and C. M. Lazarus. 1999. Ketosynthase domain probes identify two subclasses of fungal polyketide synthase genes. *Fungal Genet. Biol.* 26: 209-223.
- Bu'Lock, J. D., and A. J. Ryan. 1958. The biogenesis of patulin. *Proc. Chem. Soc.* 222-223.
- Charda, B. S., and H. S. Garcha. 1992. Mixed cultivation of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus ochraceus* for improved cellulose production. *Acta Microbiol. Hung.* 39: 61-67.
- Chen, K. C., W. S. Yin, C. Tiu, and J. Y. Houn. 1994. 11 alpha-hydroxylation of progesterone using modified alginate-immobilized cells. *Enzyme Micro. Technol.* 16: 551-555.
- Dao, H. P., F. Mathieu, and A. Lebrihi. 2005. Two primer pairs to detect OTA producers by PCR method. *Inter. J. of Food and Microbiol.* In press.
- Dragan, Y. P., and H. C. Pitot. 1994. Aflatoxin carcinogenesis in the context of the multisage nature of cancer. In: *The toxicology of aflatoxins* (Eaton, D.L and Groopman, J.D., Eds.), pp. 179-206. Academic Press, London.

Edwards, S. G., J. O'Callaghan, and A. D. W. Dobson. 2002. PCR-based detection and quantification of mycotoxigenic fungi. *Mycol. Res.* 106: 1005-1025.

Fazekas, B., A. K. Tar, and M. Zomborszky-Kovacs. 2002. Ochratoxin A contamination of cereal grains and coffee in Hungary in the year 2001. *Acta Veterinaria Hungarica.* 50 (2), 177-188.

Fulton, T. R., N. Ibrahim, M. C. Losada, D. Grzegorski, and J. S. Tkacz. 1999. A melanin polyketide synthase (PKS) gene from *Nodulisporium* sp. that shows homology to the *pks1* gene of *Colletotrichum lagenarium*. *Mol. Gen. Genet.* 262: 714-720.

Gaisser, S., A. Trefzer, S. Stockert, A. Kirschning, and A. Bechthold. 1997. Cloning of an avilamycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces viridochromogenes* Tu57. *J. Bacteriol.* 179: 6271-6278.

Gaucher, G. M. 1979. Mycotoxin-their biosynthesis in fungi: patulin and related carcinogenic lactones. *J. Food Prot.* 42: 810-814.

Geisen, R., Mayer Z., Karolewicz A., Färber P., 2004. Development of a Real Time PCR System for detection of *Penicillium nordicum* and for monitoring Ochratoxin A production in foods by targeting the ochratoxin polyketide synthase gene. *System. Appl. Microbiol.* 27, 501-507.

Hendrickson, L., C. R. Davis, C. Roach, D. K. Nguyen, T. Aldrich, P. C. Mcada, and C. D. Reeves. 1999. Lovastatin biosynthesis in *Aspergillus terreus*: characterization of blocked mutants, enzyme activities and a multifunctional polyketide synthase gene. *J. Chem. Biol.* 6: 429-439.

Kroken, S., N. L. Glass, J. W Taylor, O. C. Yoder, and B. G. Turgeon. 2003. Phylogenomic analysis of type I polyketide synthase genes in pathogenic and saprobic ascomycetes. *PNAS.* 100: 15670-15675.

Kumar, K., K. Tamura, I. B. Jakobsen, and M. Nei. 2001. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.

Lee, T., S. H. Yun, K. T. Hodge, R. A. Humber, S. B. Krasnoff, G. B. Turgeon, O. C. Yoder and D. M. Gibson. 2001. Polyketide synthase genes in insect- and nematode-associated fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56:181-187.

Liou, G. F., and C. Khosla. 2003. Building-block selectivity of polyketide synthases. *Current Opinion in Chemical Biology.* 7: 1-6.

Nicholson T. P, B. A. M. Rudd, M. Dawson., C. M. Lazarus, T. J. Simpson, and R. J. Cox. 2001. Design and utility of oligonucleotide gene probes for fungal polyketide synthases. *Chem. and Biol.* 8: 157-178.

O'Callaghan, J., M. X. Caddick, and A. D. W. Dobson. 2003. A polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus*. *Microbiology.* 149: 3485-3491.

Pazoutova, S., M. Linka, S. Storkova, and H. Schwab. 1997. Polyketide synthase gene *pksM* from *Aspergillus terreus* expressed during growth phase. *Folia Microbiol. (Praha)* 42: 419-430.

Petroski, R. J., R. B. Bates G. S. Linz, and J. P. Rosazza. 1983. Microbial transformation of natural aintitumor agents. XII. Conversion of bouvardin to O-desmethyl-bouvardin and bouvardin catechol. *J. Pharm. Sci.* 72: 1291-1293.

Sekiguchi J., S. Katayama, and Y. Yamada. 1987. 6-Methyl-1,2,4-Benzenetriol, a new intermediate in penicillic acid biosynthesis in *Penicillium cyclopium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1531-1535.

Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning. Cold Spring Harbor laboratory press.

Takano, Y., Y. Kubo, K. Shimizu, K. Mise, T. Okuno, and I. Furusawa. 1995. Structural analysis of *PKS1*, a polyketide synthase gene involved in melanin biosynthesis in *Colletotrichum lagenarium*. Mol. Gen. Genet. 249: 162-167.

Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. 24: 4876-4882.

Van der Merwe, K. J., P. S. Steyn, L. Fourie, B. de Scott, and J. J. Theron. 1965. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* wilh. Nature 205, 1112-1113.

Varga, J., K. Rigó, S. Kocsubé, B. Farkas, and K. Pál. 2003. Diversity of polyketide synthase gene sequences in *Aspergillus* species. Res. in Microbiol. S0923-2508.



**Table 1:** Putative identified polyketide synthases from *A. ochraceus* NRRL 3174 in this study

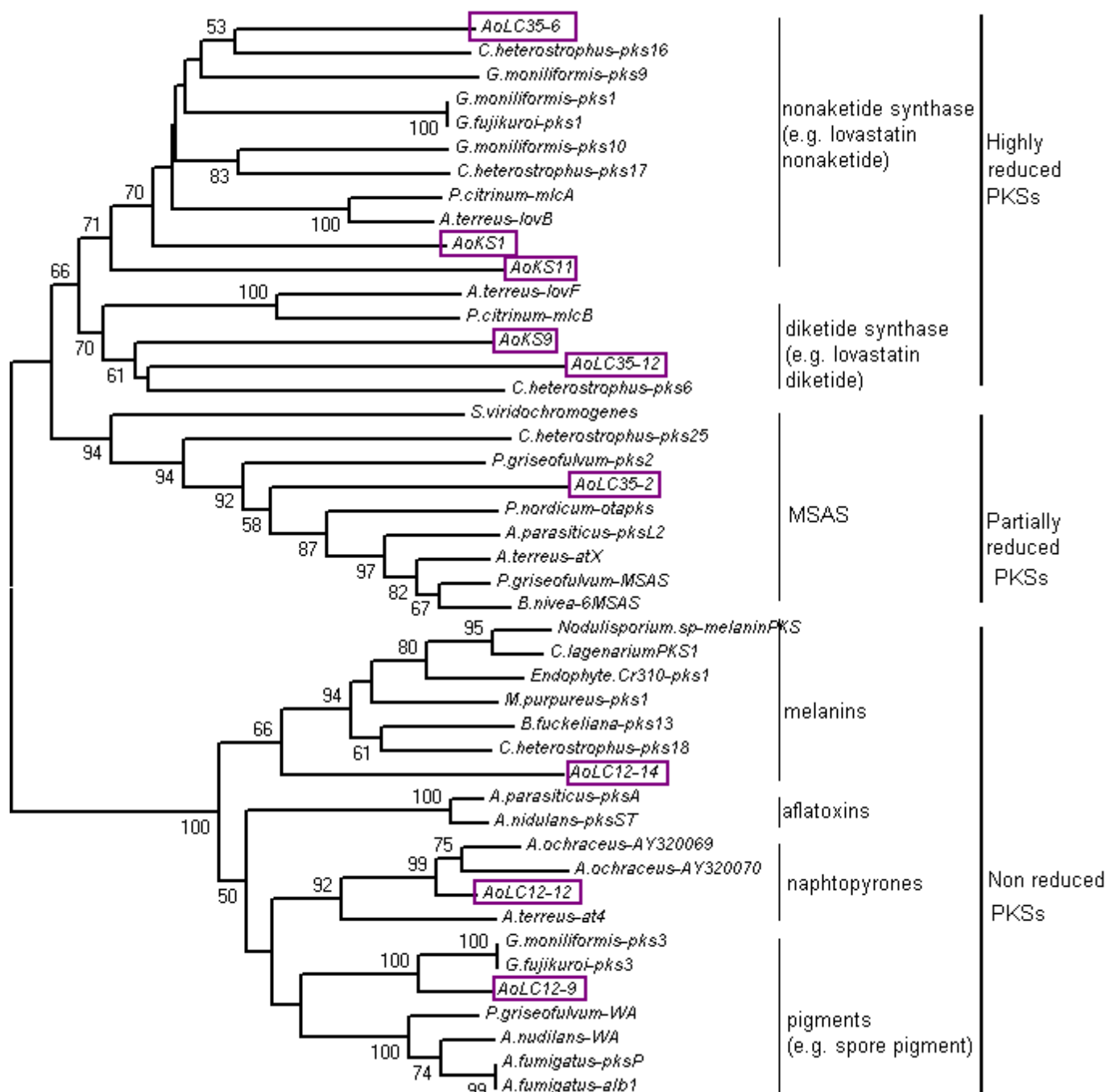
Name	Primer pair used	Accession number
AoKS1	KS1/KS2	AY583209
AoKS9	KS1/KS2	AY583207
AoKS11	KS1/KS2	AY540950
AoLC35-2	LC3/LC5c	AY540947
AoLC35-6	LC3/LC5c	AY540951
AoLC35-12	LC3/LC5c	AY583208
AoLC12-9	LC1/LC2c	AY540945
AoLC12-12	LC1/LC2c	AY540946
AoLC12-14	LC1/LC2c	AY540949

```

AoKS1      GTARSITSNRYSYFFDWHGPSMTIDTACSSSLVYALHLAAKALHDGECRV-VVASGTNLILAPNMYISESKLSMLSPHG
AoLC35-6   GTSRAIMANRYSYAFDWHGPSMTIDTACSSSLVAVHQTIALRSGESRV-AVAAGSNLLLGPEPYIAESKLKMLSPDG
AoKS11     GGAPSMILSTRISYFFDWHGPSLVLDTACSSSLIALHLAVQALQKGDSCM-AVAAGSLLILSYDGYVSSSQANMMSPSG
AoKS9      GTGNSILANRISYFYDLHGPSATIDTACSSSLVCFHMQAQLRAGEADLFDCRPGPALHFDPNIFITHTDLGMLSTDG
AoLC35-12  GTSPSILANRISMFYDLRGTSQIDTACSSSLVAFHQAQCHDYRTGRSPH-SVYSGVNLIEHPAATLYLSNLGYLSPDG
AoLC35-2   GTGFTGVPNRISYHLNINGPSYSVDAAACSSSLVAVHNGVQAILEGESTV-VIAGGVHAMCGPALTRYMDKAGVLPDG
AoLC12-9   GGNRAFIIPGRNLNYFFKFSGPSYSVDTACSSSLASLHVACNALWRGDIOT-AIAGGTHVLTNPDTAGLDRGHFLSRTG
AoLC12-12  GGNRAFLSGRISYFFRFCGPSLSIDTACSSSFARIQTACAYLWRGECOT-ALAGGVYVMTNPDNFAGLDRGHFLTITKG
A.ochraceus-pks GGNRAFLSGRISYFFRFCGPSLTIDTACSSIFARILTTAYLWRGECOT-ALAGGVYVMTNPDNFAGLDRGHFLTITKG
A.ochraceusO4-pks GGNRAFLSGRITNFFRFCGPSLTIDTAYSISIFARILTACAYLWSGXCDSDLAGGVYVMTNPDNFAGLDRGHFLTITKG
AoLC12-14  GGVRAFGPGRLNYHFGWEGPSYSIDAACSSMAIQTGLTALRSRECDM-TVAGGANIMTSSDPFAGLDRGSFLSPTG
Consensus  Gt.r.....nRisgffd..GpS.t!DtACsSslva.h.a..al..ge.....va.G.nl....p.....s.....Lsp.G

```

**Fig. 1.** Alignment of *A. ochraceus* NRRL 3174 KS domains identified in this study and A.ochraceus-pks (*A. ochraceus* NRRL 3174), and A.ochraceusO4-pks (*A. ochraceus* O4) obtained by Varga *et al.* (2003)

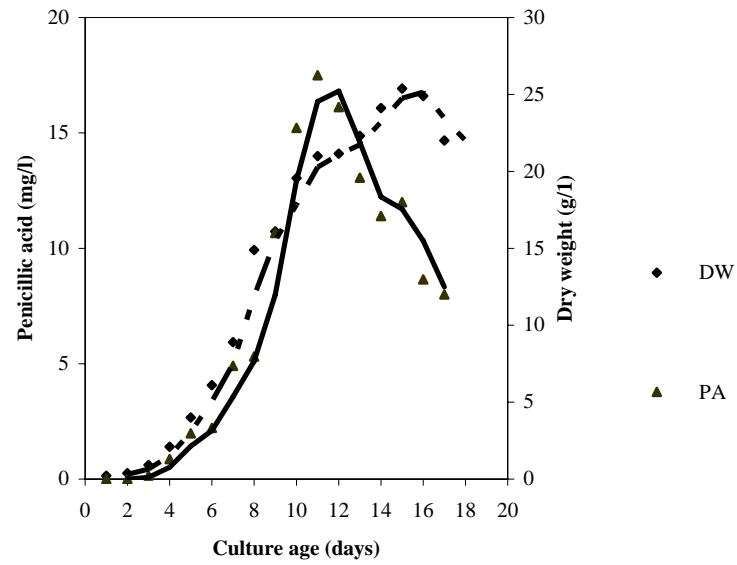


**Fig. 2.** Neighbor-joining phylogenetic tree of KS sequences of fungal PKSs. Bootstrap values above 50 are shown on branches. The fungal PKS clusters are indicated on the right. Abbreviation and accession numbers of PKS sequences used:

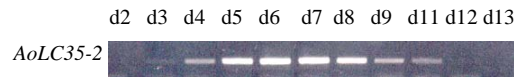
*Aspergillus fumigatus*: alb1 ([AAC39471.1](#)); *A. terreus*: lovB ([AAD39830.1](#)), lovF ([AAD34559.1](#)), atX ([BAA20102.1](#)), at4 ([BAB88689.1](#)); *A. parasiticus*: pksP (CAA76740), pksL2 ([AAC23536.1](#)); *Aspergillus nidulans*: WA ([CAA46695.2](#)), pksST ([AA81586](#)); *Botryotinia fuckeliana*: pks6 ([AAR90242.1](#)), pks13 ([AAR90249.1](#)); *Byssoschlamys nivea*: MSAS ([AAK48943.1](#)), *Cochliobolus heterostrophus*: pks6 ([AAR90261.1](#)), pks16 ([AAR90270.1](#)), pks17 ([AAR90271.1](#)), pks18 ([AAR90272.1](#)), pks25 ([AY495666](#)); *Colletotrichum lagenarium*: pks1 ([BAA18956.1](#)); Cr310 (AAP68698); *Gibberella fujikuroi*: pks1 ([CAC44633.1](#)), pks3 ([CAC88775.1](#)); *Gibberella moniliformis*: pks1 ([AAR92217.1](#)), pks3 ([AAR92210.1](#)), pks9 ([5AAR92216](#)), pks10 ([AAR92217.1](#)); *Monascus purpureus*: pks1 ([CAC94008.1](#)); *Nodulisporium sp.*: pks1 ([AAD38786.1](#)); *Penicillium citrinum*: mlcA ([BAC20564.1](#)), mlcB ([BAC20566.1](#)).

*Penicillium griseofulvum*: pks2 ([AAB49684.1](#)), MSAS (S13178), WA (CAB44713); *P. nordicum* (AAP33839), *Streptomyces viridochromogenes*: orsellinic acid (T32871). *A. ochraceus* NRRL 3174: AoKS1 (AY583209), AoKS9 (AY583207), AoKS11 (AY540950), AoLC35-2 (AY540947), AoLC35-6 (AY540951), AoLC35-12 (AY583208), AoLC12-9 (AY540945), AoLC12-12 (AY540946), AoLC12-14 (AY540949), A.ochraceus-pks (AY320069). *A. ochraceus* O4: A.ochraceusO4-pks (AY320070).

A



B



**Fig. 3.** Kinetic of penicillic acid (PA) production during growth of *A. ochraceus* (DW) at 25°C in synthetic medium (A) and expression of *AoLC35-2* sequence by RT-PCR (B).

# **CHAPITRE III. Caractérisation d'un gène polycétone syntase intervenant dans la biosynthèse des tétra et pentacétones chez *A. ochraceus* NRRL 3174**

# Chapitre III. Caractérisation d'un gène polycétone synthase intervenant dans la biosynthèse des tétra et pentacétones chez *A. ochraceus* NRRL 3174

## Introduction

Dans l'étude précédente, nous avons révélé la présence de 9 PKS différentes chez *A. ochraceus* NRRL 3174. Pour essayer d'attribuer un rôle à ces PKS dans la biosynthèse de polycétones, il est souhaitable d'inactiver le gène chez ce champignon en réalisant la technique de rupture de gène. Il est donc important de disposer pour chaque PKS d'une séquence d'ADN plus longue (~2000 bp), au-delà du domaine KS obtenu, en séquençant le gène vers l'extrémité 3'.

Nous nous sommes particulièrement intéressés aux gènes codant pour des PKS qui pourraient intervenir dans la biosynthèse d'OTA, de melleine, d'hydroxymelleine et d'acide pénicillique. L'OTA, la melleine et l'hydroxymelleine sont des pentacétones réduits tandis que l'AP est un tétracétone dérivé de l'acide orsellinique, un polycétone non réduite. Suite aux résultats préalablement obtenus sur la diversité des PKS chez *A. ochraceus* NRRL 3174, nous avons donc choisi d'allonger d'une part les séquences AoKS1, AoKS9, AoKS11, AoLC35-6 et AoLC35-12 (pour des polycétones réduits) d'autre part la séquence AoLC35-2 (pour des polycétones partiellement réduits).

En se basant sur la conservation du domaine acyltranferase (AT), un des trois domaines principaux d'une PKS, des amorces dégénérées ont été dessinées pour amplifier sur nos 6 séquences la région d'ADN reliant les domaines KS et AT. Ainsi nous disposerons de séquences d'ADN plus longues pour essayer ensuite d'en déterminer le rôle en utilisant la technique de rupture de gène.

## Résultats et Discussion

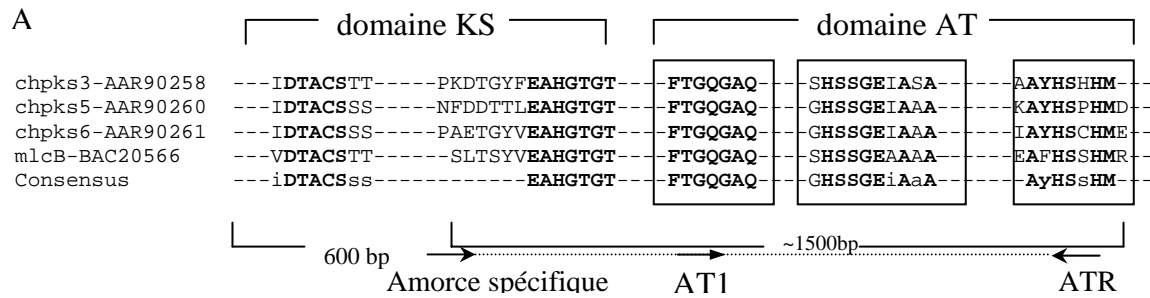
### 1. Allongement des séquences AoKS1, AoKS9, AoKS11, AoLC35-6 et AoLC35-12

Un alignement des séquences des PKS de polycétones réduits ayant une forte identité avec les domaines KS d'*A. ochraceus* NRRL 3174 (AoKS1, AoKS9, AoKS11, AoLC35-6 et AoLC35-12) a montré trois régions conservées dans le domaine AT (Fig. 15A). Une amorce dégénérée (ATR) a été déduite pour la région **AYHSSHM**. Afin d'allonger nos 5 séquences vers l'extrémité 3', l'amplification par PCR est réalisée sur l'ADN génomique d'*A. ochraceus* NRRL 3174 en utilisant l'amorce ATR et une amorce spécifique correspondant à l'extrémité 3' de chacune de nos 5 séquences d'ADN (Fig. 15B) (Tableau 7).

**Tableau 7 :** Séquence d'amorces spécifiques et dégénérées pour amplifier le domaine AT des PKS réduites identifiées chez *A. ochraceus* NRRL 3174.

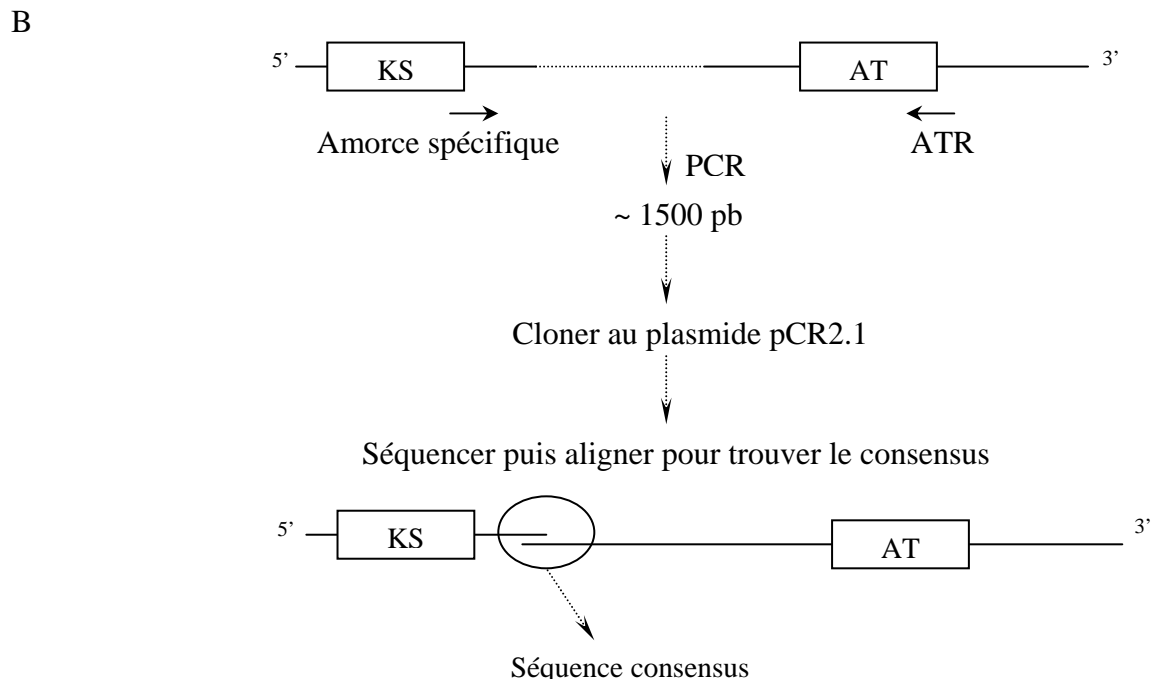
Amorce	Séquence (5'-3')	Séquence ciblée
KS1-ATL	GGATCGATGCCAGTATTTTGAAGC	Domaine AT de la PKS AoKS1
KS9-ATL	CTTGGAATGCTGTCTACTGACGG	Domaine AT de la PKS AoKS9
KS11-ATL	CCAATTCTTTGAAGCCCATGGCAC	Domaine AT de la PKS AoKS11
LC356-ATL	AAAGGTCAATCTAACAGTTGGCTC	Domaine AT de la PKS AoLC35-6
KS-ATL	TACAAAGCCGCAAGTCTTGATC	Domaine AT de la PKS AoLC35-12
ATR	CATRTGRTGIGARTGRTAIGC	Domaine AT des PKS réduites
AT1	TTYACIGGICARGGIGCICARTGG	

I : Inosine ; R : A/G ; Y : C/T



Taille du produit PCR avec couple d'amorces:

- Amorce spécifique/ATR : ~1500 pb
- AT1/ATR : ~650 pb



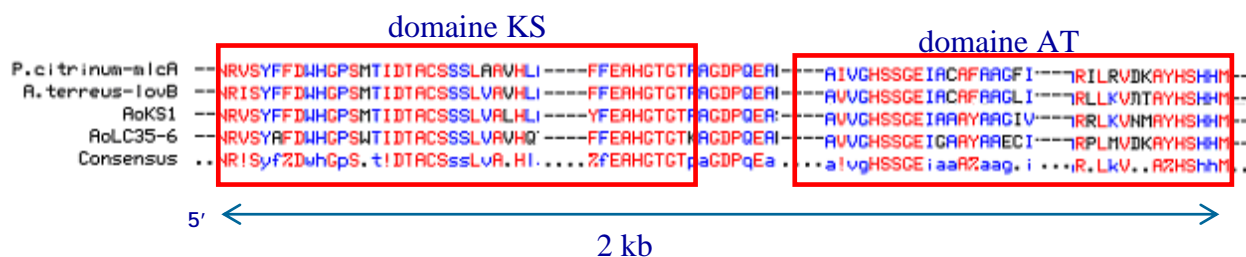
**Fig. 15.** Stratégie d'allongement du côté 3' des séquences PKS d'*A. ochraceus* NRRL 3174 par PCR sur l'ADN génomique en utilisant une amorce spécifique et une amorce dégénérée.

**A :** Reconnaissance des régions conservées du domaine AT par alignement de différentes séquences PKS de banques de données : chpks5 (N° d'Accession : AAR90260), chpks6 (N° : AAR90261) (*Cochliobolus heterostrophus*); mlcB (dicétone synthase de la compactine, BAC20566, *P. citrinum*).

**B :** Clonage et séquençage du domaine AT.



La taille attendue des produits PCR est d'environ 1500 pb. Les amplifications réalisées avec les séquences AoKS9 et AoKS11 n'ont pas permis l'obtention de produit PCR de la taille attendue. Seules les amplifications pour les séquences AoKS1, AoLC35-6 et AoLC35-12 ont donné des résultats positifs. Les séquences KS-AT correspondant à AoKS1, AoLC35-6 et AoLC5-12 possèdent toutes le motif (V/T)(G/S)HSSGE(A/I)A(A/C) caractéristique du domaine AT des PKS (Fig. 16).

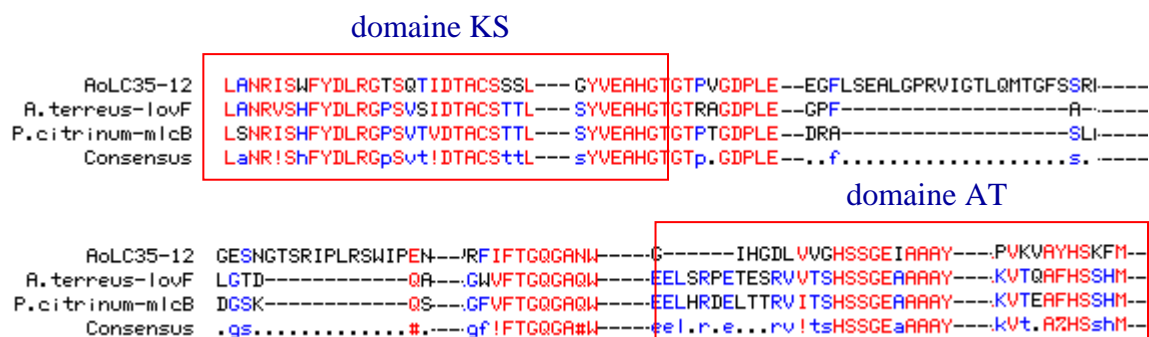


**Fig 16.** Alignement des domaines KS et AT des séquences AoKS1 et AoLC35-6 avec les nonacétone synthases (lovB et mlcA) d'*A. terreus* et *P. citrinum* respectivement. Les motifs conservés du domaine KS, **D(T/A)AC(S/A)SS** et du domaine AT, **(V/T)(G/S)HSSGE(A/I)A(A/C)** sont trouvés sur ces PKS.

Pour *AoKS1*, la séquence finale comprenant les domaines KS et AT est de 2017 pb avec un intron de 55 pb. La séquence en acides aminés correspondante montre une identité de 50% avec les nonacétone synthases d'*A. terreus* (lovB) et de *P. citrinum* (mlcA). On voit bien que le pourcentage d'identité de cette séquence, comprenant les domaines KS et AT avec les mêmes PKS (lovB et mlcA) est moins important que lorsque seul le domaine KS était pris en compte. Ceci est dû au fait que le domaine KS est le plus conservé parmi les domaines catalytiques d'une PKS. Plus les séquences sont allongées vers l'extrémité 3' du gène, moins les domaines actifs sont conservés. En plus, on ajoute des zones non conservées entre les domaines actifs dans la séquence finale. Pour *AoLC35-6*, la taille de la

séquence finale est de 1999 pb dont un intron de 80 pb. Comme AoKS1, cette séquence présente environ une identité d'environ 50% avec lovB et mlcA.

Pour AoLC35-12, une séquence finale de 2300 pb comprenant les domaines KS et AT a été obtenue. Cette séquence contient 2 introns, l'un de 66 et l'autre de 113 pb, et montre seulement 32% d'identité avec les dicétones synthases ainsi qu'avec les nonacétones synthases d'*A. terreus* et de *P. citrinum*. Cependant cette séquence est plus longue que celle des domaines équivalents des dicétones synthases lovF et mlcB chez *A. terreus* et *P. citrinum* respectivement. (Fig. 17). De plus elle montre une partie commune avec le domaine AT d'une PKS caractérisé par O'Callaghan *et al.* (2004) chez *A. ochraceus* HP99. La rupture de ce gène par ces auteurs a donné un mutant *A. ochraceus* NUIC118 non producteur d'OTA.



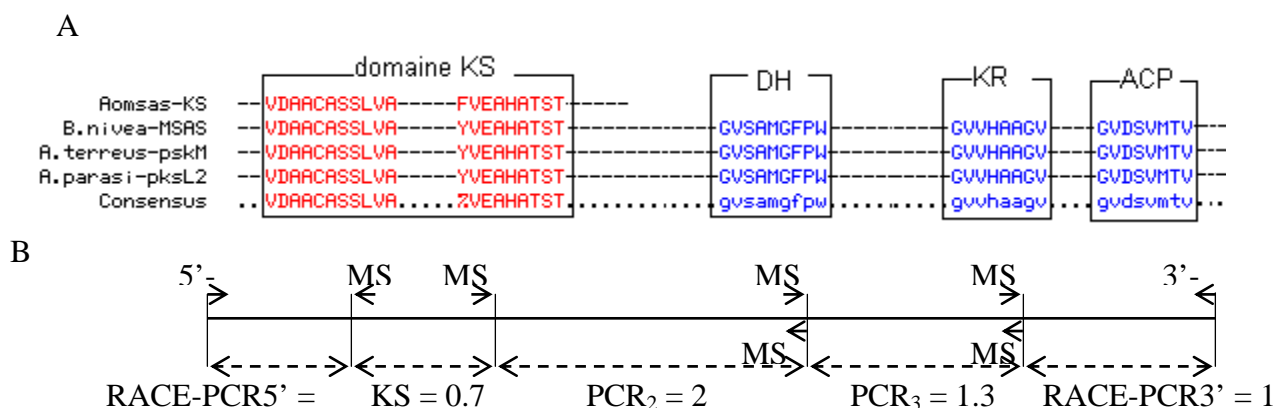
**Fig. 17.** Les domaines KS-AT de la séquence AoLC35-12 sont plus longs que ceux trouvés chez les dicétones synthases d'*A. terreus* (lovF) et de *P. citrinum* (mlcB).

Pour ne pas rester sur un échec dans le cas de l'allongement du côté 3' des séquences AoKS9 et AoKS11, nous avons fabriqué une autre amorce dégénérée AT1 (Tableau amorces AT) déduite d'une autre région conservée du domaine AT : **FTGQGAQ** (Fig. 15). L'amplification par PCR avec le couple d'amorces AT1/ATR sur l'ADN génomique d'*A. ochraceus* a donné trois séquences AT d'environ 650 pb dont deux sont retrouvées intégralement dans l'allongement des séquences AoKS1 et AoLC35-6 préalablement obtenues. La troisième, AoAT2 (N° d'accension: AY5409438) montre une identité de 40 à 42 % avec la PKS (rôle inconnu) de *Cochliobolus heterostrophus* (N° AAB08104.1) et la

nonacétone synthase *mlcA* de *P. citrinum*. Les amplifications croisées en utilisant une amorce spécifique de ce domaine AoAT2 et une amorce spécifique de chaque domaine KS identifié (AoKS9 ou AoKS11) ont été faites. Cependant aucune séquence valable n'a été obtenue. AoAT2 appartient sans doute à une autre PKS d'*A. ochraceus* qui n'a pas encore été relevée par les couples d'amorces KS1/KS2, LC1/LC2c et LC3-LC5c.

## 2. Séquençage du gène *Aomsas*

Le domaine ketosynthase AoLC35-2 montre 60-68% d'identité avec des PKS de type MSAS, intervenant dans la biosynthèse de patuline chez *B. nivea*, *A. terreus* et *A. parasiticus*. L'alignement de ces MSAS donne des régions conservées (Fig. 18A) à partir desquelles les amorces dégénérées MS2 et MS4 ont été dessinées (Fig. 18B).



**Fig. 18.** A : Alignement du domaine KS de *aomsas* avec les PKS du groupe MSAS.

B : Schéma de combinaison des amorces dégénérées (MS2 et MS4) et des amorces spécifiques (MS1, MS3, MS5 et MS6) utilisées dans la PCR et RACE-PCR pour amplifier, et séquencer le gène *aomsas* chez *A. ochraceus* NRRL 3174. Les amorces 5'-primer et 3'-primer sont fournies avec le kit RACE-PCR (Invitrogene).

L'amplification par PCR sur l'ADN génomique d'*A. ochraceus* NRRL 3174 avec les amorces MS1 (amorce spécifique dessinée à partir de la fin du domaine KS AoLC35-2) et MS2 nous a permis de cloner et séquencer une partie de 2 kb reliant les domaines KS et DH. Une amorce spécifique MS3 a donc été dessinée à partir de la fin de cette dernière partie. Avec MS3 et MS4 on amplifie puis séquence une partie de 1,3 kb reliant les domaines DH et KR. Les deux extrémités 5' et 3' du gène ont été amplifiées par la RACE-PCR (Rapid amplification of cDNA ends PCR) en utilisant le kit fourni par Invitrogen et leur recommandation. Toutes ces amplifications ont été séquencées et ont permis la reconstitution totale du gène.

La taille du gène *Aomsas* est de 5289 pb, sa traduction donne une séquence de 1763 acides aminés. Elle montre environ 52% d'identité au niveau de la séquence d'acides aminés avec MSAS de *B. nivea*, atX d'*A. terreus*, pksL2 d'*A. parasiticus* et MSAS de *P. griseofulvum*. L'alignement de séquence d'acides aminés avec ces PKS montre que *Aomsas* contient les 5 domaines catalytiques KS, AT, DH, KR et ACP dans l'ordre cité.

Nous avons jusqu'à maintenant séquencé la totalité d'un gène PKS de type MSAS (*aomsas*) et trois séquences d'ADN couvrant les domaines KS et AT des PKS correspondant à AoKS1, AoLC35-6, AoLC35-12. Deux parmi elles, AoKS1 et AoLC35-6 sont proches des PKS du groupe des nonacétone synthases (~60% d'identité). La troisième, AoLC35-12, a une identité de 32% avec les dicétones synthases ainsi que les nonacétone synthases caractérisées chez *A. terreus* et *P. citricinum*. Il faut rappeler que l'implication de la PKS correspondant à AoLC35-12 dans la biosynthèse d'OTA chez *A. ochraceus* a été démontrée (O'Callaghan *et al.*, 2003).

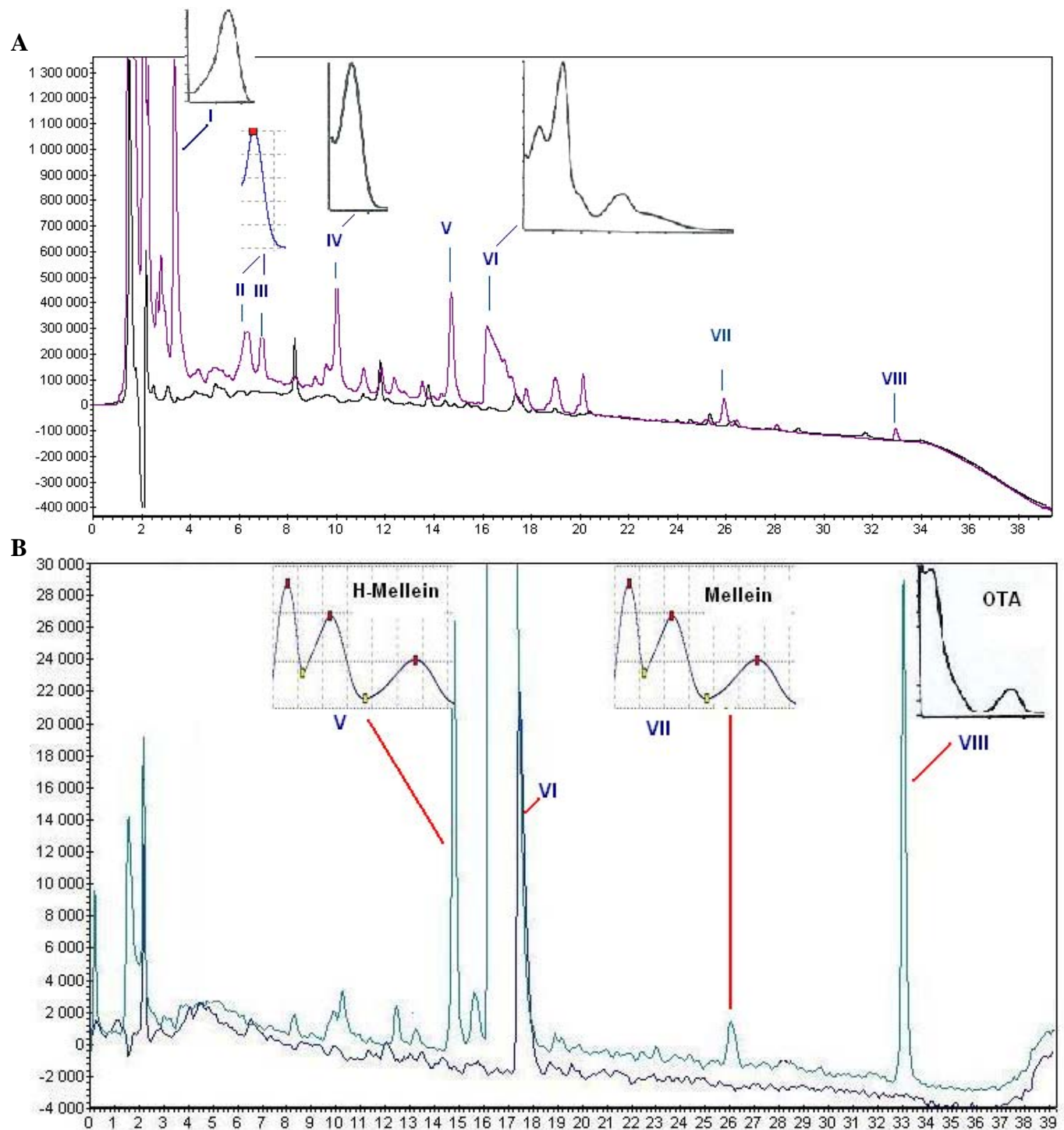
Pour connaître le rôle de AoKS1, AoLC35-6 et *Aomsas* dans la production des polycétones d'*A. ochraceus*, nous envisagerons de réaliser la rupture de ces gènes et la production de mutants ciblés.

### 3. Obtention du mutant *A. ochraceus* MINCUN109 par rupture du gène *aomsas*

Tout d'abord, un fragment de 2 kb du gène *aomsas* a été cloné dans le plasmide pCRTPO2.1. Ensuite, la cassette de résistance hygromycine B phosphotransférase (*hph*) d'*Escherichia coli*, générée à partir du plasmide pID21 (Tang *et al.*, 1992) a été insérée dans ce fragment de 2 kb pour former le vecteur de transformation. La transformation a été faite par la fusion de ce dernier avec des protoplastes d'*A. ochraceus* NRRL 3174.

Pour la préparation des protoplastes, les spores d'*A. ochraceus* NRRL 3174 sont inoculées ( $10^5$  spores/ml) dans 500 ml de milieu YES (1M saccharose, 20 g d'extrait de levure, 1 litre de H<sub>2</sub>O) à 30°C et sous agitation (120 rpm) jusqu'à la germination (environ 18h). Le mycélium est récupéré par filtration puis resuspendu dans le tampon phosphate 10mM (O'Callaghan *et al.*, 2003). La formation des protoplastes est obtenue par addition d'un enzyme de lyse (Sigma) pendant 1h30 à 30°C et 80 rpm. La concentration finale de mycélium dans le mélange de lyse est de 100g/l et celle d'enzyme de lyse est de 4g/l.

L'intégration de la cassette *hph* confère au champignon la résistance à l'hygromycine B et donc permet la sélection des clones transformés dont le gène *aomsas* a été inactivé. L'interruption d'*aomsas* a permis l'obtention du mutant *A. ochraceus* MINCUN109. En comparant le profil métabolique (HPLC) de ce mutant à celui de la souche sauvage, nous avons constaté que ce mutant ne produit plus d'AP, de patuline ni d'asperlactone. Aucune trace d'acide orsellinique n'a été détectée dans la culture de ce mutant. La rupture de gène a touché aussi la production de melleine, hydroxymelleine ainsi que d'OTA. La viomelleine est toujours produite mais à un niveau plus faible (Fig. 19). Cependant, nous n'avons pas observé de différence au niveau de la sporulation, de la pigmentation, ou de la vitesse de croissance entre la souche sauvage et le mutant.



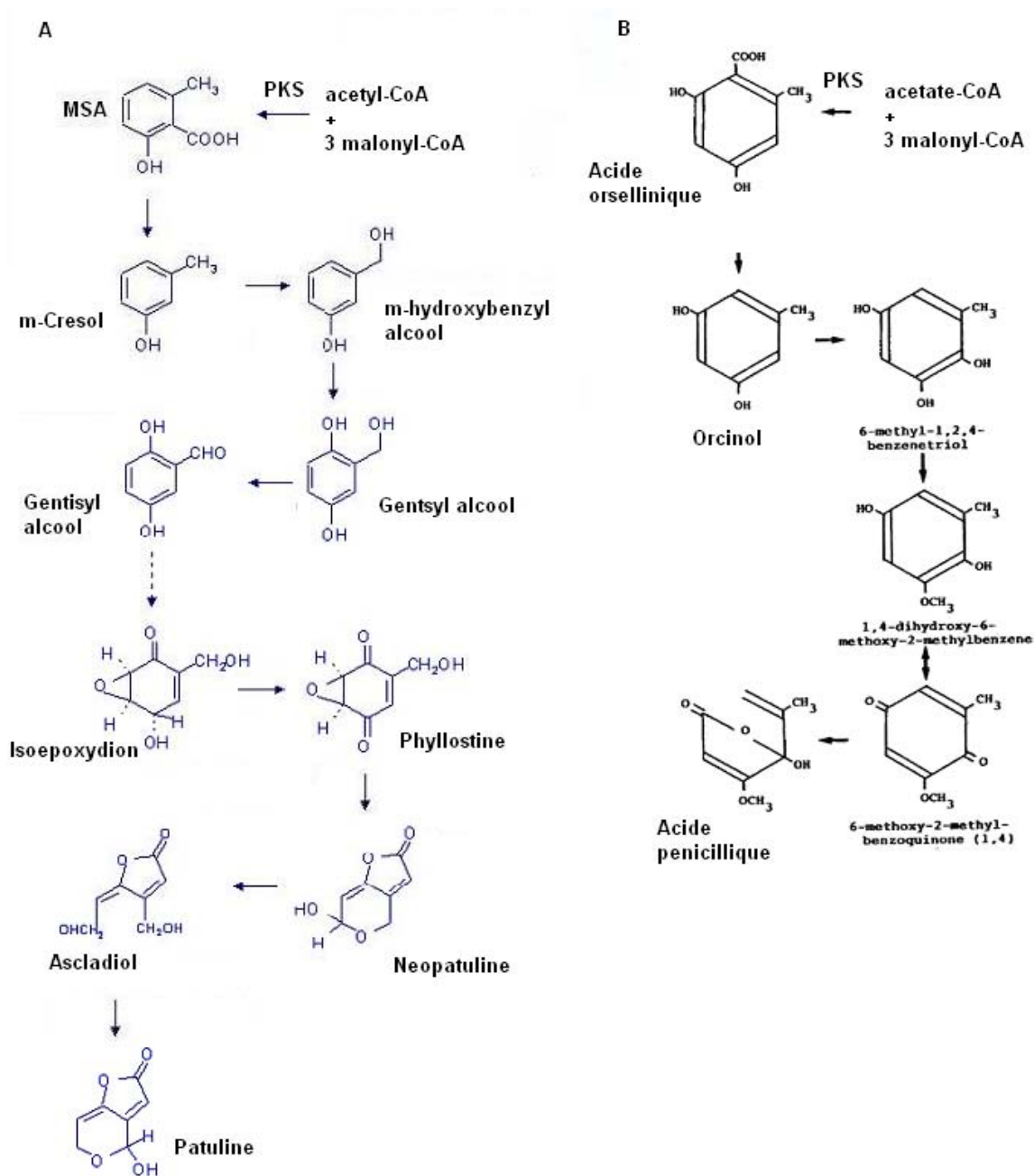
**Fig. 19. (A).** Comparaison du profil HPLC (UV=220 nm) d'*A. ochraceus* NRRL 3174 (ligne violette) et celui du mutant *A. ochraceus* MINCUN109 (ligne noire).

Maximum d'absorption (UV) de patuline (I) : 276 ; isoasperlactone (II) et asperlactone (III) : 220 ; acide pénicillique (IV) : 227 ; hydroxymelleine (V) et melleine (VII) : 215, 245 et 315 ; viomelleine (VI) : 223, 265, 294 et 276 ; ochratoxine A (VIII) : 225 et 332 nm.

**(B).** Comparaison du profil HPLC (fluorescence) d'*A. ochraceus* NRRL 3174 (ligne verte) et celui du mutant *A. ochraceus* MINCUN109 (ligne noire).

Lors de la comparaison de la séquence Aomsas avec les MSAS disponibles dans les banques de données, le score d'identité le plus important (52%) est obtenu avec les MSAS de *B. nivea* et *P. griseofulvum*, producteurs de patuline. Cependant, le gène *aomsas* semble relativement éloigné des MSAS codant pour la patuline. En effet, la MSAS de *B. nivea* ressemble à celle de *P. griseofulvum* avec 75% d'identité. L'inactivation du gène *aomsas* chez *A. ochraceus* NRRL 3174 a provoqué la disparition d'acide pénicillique et de patuline. Ces deux mycotoxines sont souvent produites par des espèces différentes. Cependant leurs voies de biosynthèses peuvent être relativement semblables (Axberg et Gatenkeck, 1975 ; Sekiguchi *et al.*, 1987) (Fig. 20). Le MSA et l'acide orsellinique, précurseurs respectivement de patuline et d'AP sont tous les deux produits par des PKS de type MSAS, à partir d'une unité acetate et trois unités malonate. La formation du MSA nécessite une réduction pour le groupe  $\beta$ -cétone au deuxième cycle de condensation tandis qu'aucune modification de la chaîne de la polycétone n'est impliquée dans le cas de l'acide orsellinique (Gaucher, 1968 ; Jordan et Spencer, 1993). Cette différence majeure explique l'absence du domaine KR chez l'acide orsellinique synthase bactérienne. La réduction de la chaîne de polycétone par la MSAS lors de la synthèse de patuline nécessite la présence de NADH (Gaucher, 1968). En absence de NADH, la MSAS ne catalyse pas la formation de MSA, comme attendu, mais aucune formation d'acide orsellinique n'est cependant observée. Chez *A. ochraceus*, une des hypothèses est que le gène *aomsas* pourrait générer des intermédiaires pour les deux voies de biosynthèses d'AP et de patuline.

Le mutant *A. ochraceus* MINCUN109 perd également la capacité de produire asperlactone et isoasperlactone. Par le marquage radioactif, Staunton *et al.* (1991) ont démontré chez *A. melleus* que ces deux pentacétones dérivent du même précurseur, un lactone diepoxy. Nos résultats obtenus chez *A. ochraceus* montre que Aomsas intervient dans la biosynthèse de ces deux molécules. Ces deux produits pourraient être générés à partir d'AP ou à partir d'un intermédiaire métabolique commun avec celui-ci. En effet, le MSA est une tétracétone. Pour former un pentacétone, la chaîne du tétracétone généré à partir de la MSAS doit subir une autre condensation avec un acétate. Un processus semblable chez *M. ruber* a été proposé par Hajjaj *et al.* (1999) dans lequel les auteurs montrent que la biosynthèse de citrine et des pigments rouges polycétones se ferait à partir d'un même intermédiaire métabolique, un tétracétone.



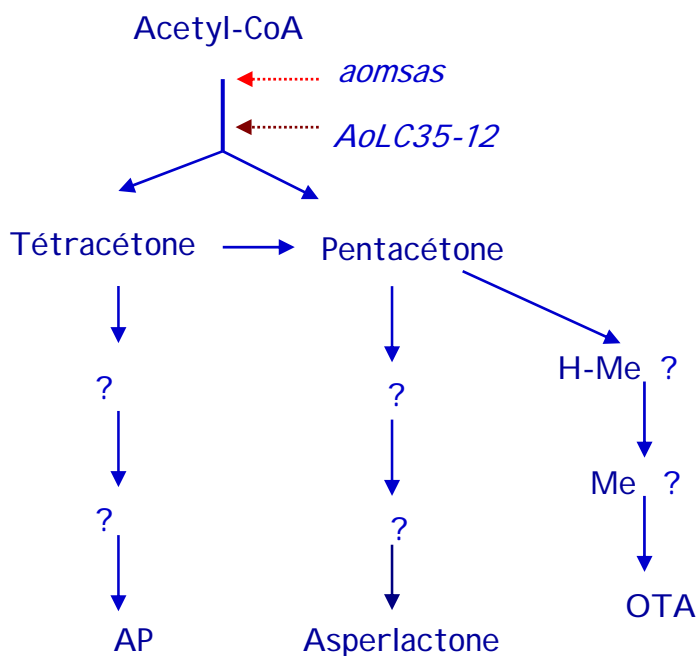
**Fig. 20. A :** Voie de biosynthèse de patuline *P. patulum* (d'après Zamir *et al.*, )

**B :** Voie de biosynthèse d'acide penicillique (d'après Sekiguchi *et al.*, 1987)



Nous pouvons penser que le gène *aomsas* coderait pour la biosynthèse des lactones comme AP et asperlactone. Mais il semble que son rôle soit plus large. Cependant il n'interviendrait que dans la biosynthèse de tétra et pentacétones comme OTA, melleine. La biosynthèse de viomelleine, un heptacétone ne semble pas être totalement annulée par cette mutation. De même, nous n'avons pas observé de différence au niveau de la pigmentation entre le mutant et la souche sauvage. Ceci veut dire que la production de pigments polycétones (naphtopyrone, mélanine) n'est pas réprimée chez le mutant.

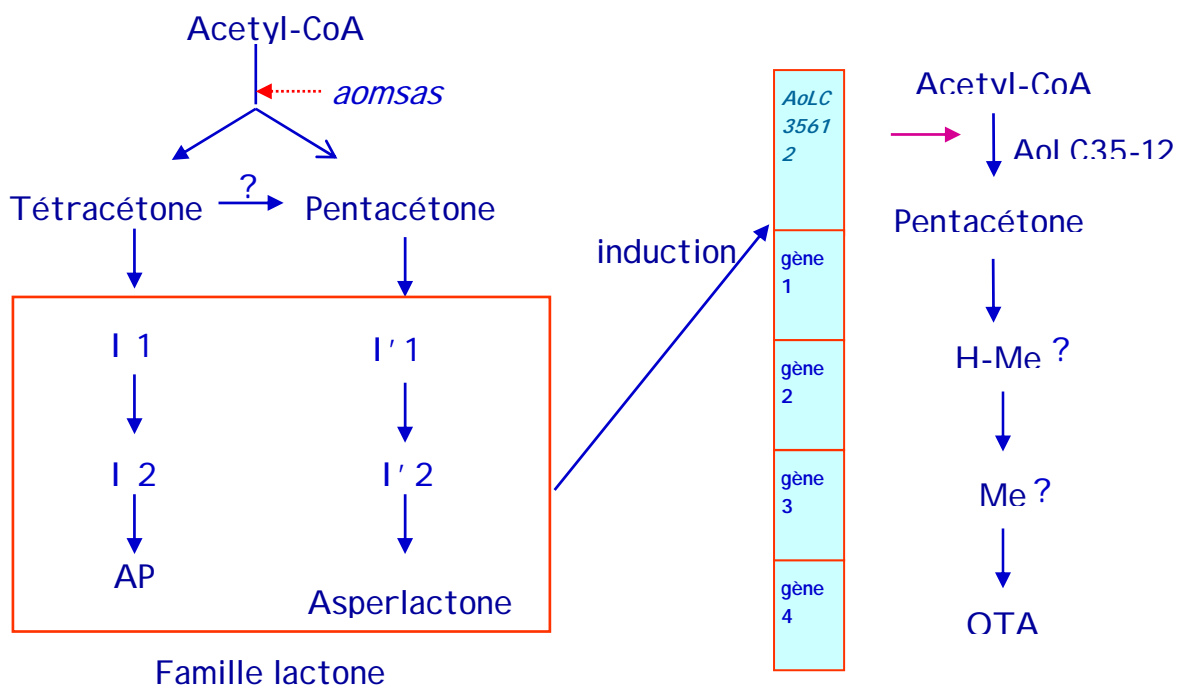
Deux possibilités sur le rôle de *aomsas* peuvent être envisagées. La première est que le gène *aomsas* intervienne directement en tant qu'enzyme de la voie de biosynthèse d'OTA comme cela a été montré par Geisen *et al.* (2004) chez *P. nordicum*. En effet, ces auteurs ont montré qu'une PKS de type MSAS interviendrait dans la biosynthèse d'OTA chez cette espèce. L'interruption de ce gène entraîne la disparition de la production d'OTA chez *P. nordicum*, cependant ces auteurs ne donnent aucun résultat sur la production de melleine, hydroxymelleine ainsi que sur d'autres polycétones.



**Schéma 1.** Cluster de *aomsas* et celui de *AoLC35-12* en associé ?

Chez *A. ochraceus* HP99, O'Callaghan *et al.* (2003) ont montré que l'enzyme responsable de la synthèse de l'OTA est une PKS de type nonacétone synthase. Comme nous l'avons montré, cette PKS est la même que AoLC35-12. Il existe donc deux PKS intervenant dans la biosynthèse d'OTA chez *A. ochraceus*. Probablement le cluster contenant *aomsas* et celui contenant *AoLC35-12* seraient en associés. L'interruption de *aomsas* pourrait provoquer l'inactivation de *AoLC35-12*. Dans ce cas, on pourrait imaginer les voies de biosynthèse dans lesquelles ces deux gènes interviennent comme indiqué au schéma 1.

La seconde possibilité est que le gène *aomsas* produise un intermédiaire de type lactone lors de la biosynthèse d'AP (Schéma 2). Cet intermédiaire induirait l'expression des gènes intervenant dans la biosynthèse d'OTA. En effet, certaines lactones ont été rapportés comme des inducteurs importants des métabolites secondaires chez les champignons. Chez *A. terreus*, l'ajout de  $\gamma$ -butyrolactone I permet une sporulation importante et aussi une augmentation du titre de la lovastatine (Schimmel *et al.*, 1998).



**Schéma 2.** *aomsas* produit des inducteurs?

## **Article 2:**

(Submitted in Applied and Environmental Microbiology)

### **Characterization of a polyketide synthase gene involved in the biosynthesis of penicillic acid in *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174**

Huy Phong Dao<sup>1</sup>, Florence Mathieu<sup>1</sup>, John O'Callaghan<sup>3</sup>, Olivier Puel<sup>2</sup>, Alan Dobson<sup>3</sup>, and Ahmed Lebrihi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Département Bioprocédés et Systèmes Microbiens, Laboratoire de Génie Chimique UMR5503 (CNRS/INPT/UPS), Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse, Institut National Polytechnique de Toulouse, 1, avenue de l'Agrobiopôle, BP32607, 31326 Castanet Tolosan, France.

<sup>2</sup>Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie, Institut National de Recherche Agronomique, BP 3, 180 chemin de Tournefeuille, 31931 Toulouse cedex 9, France

<sup>3</sup>Department of Microbiology, University College Cork, National University of Ireland Cork, Cork, Ireland.

Section: Mycology

Running title: penicillic acid synthase gene from *A. ochraceus*.

\* Corresponding author

Tel: 00 33 (0)5 62 19 39 44

Fax: 00 33 (0)5 62 19 39 01

E-mail: [lebrihi@ensat.fr](mailto:lebrihi@ensat.fr)

## Abstract

Penicillic acid (PA) is a mycotoxin produced by many species of *Penicillium* and *Aspergillus* including *Aspergillus ochraceus*. A polyketide synthase gene *aomsas* involved in the biosynthesis of this mycotoxin was cloned by using “gene walking” strategy. The size of *aomsas* gene is 5298 pb which revealed one open reading frame of 1766 amino acids. The predicted amino acid sequence Aomsas shows about 50% identity to 6-methylsalicylic acid synthases from *A. terreus* and *P. patulum*. The expression of *aomsas* gene, and polyketide production were also investigated in *A. ochraceus*. A mutant of *A. ochraceus* in which the *aomsas* was disrupted by inserting the *E. coli* hygromycin B phosphotransferase gene, could not produce PA. This mutant lost also the capacity to produce orsellinic acid, asperlactone and isoasperlactone. However no visible change in fungal growth, sporulation, or pigment production was observed.

Key words: *Aspergillus ochraceus*, polyketide synthase, PKS, penicillic acid, orsellinic acid, asperlactone, isoasperlactone.

## INTRODUCTION

Penicillic acid (PA), 3-methoxy-5-methyl-4-oxo-2,5-hexadienoic acid is a fungal secondary metabolite. Like patulin, isopatulin, asperlactone, isoasperlactone, and hydropenicillic acid (DHPA), PA constitutes a class of chemically relatively simple 5-membered cyclic lactones. PA has been reported to have antibacterial activities (mostly against Gram-negative bacteria), antiviral, antitumoral, and cytotoxic effects as well as exhibiting a high herbicide activity against various field weeds (6,20). The LD<sub>50</sub> for mice and rabbits (subcutaneous) is 110 mg/kg and 100-200 mg/kg respectively. PA has been shown to react with several amino acids to form less toxic products (25). PA is not mutagenic in the Ames Salmonella assay, and does not elicit DNA repair synthesis in primary hepatocytes, although it induces single- and double-stranded DNA breaks in mammalian cells (25). PA has long been known to be toxic to rat alveolar macrophages

(29) but has also recently been shown to inhibit both porcine lymphocyte proliferation (17) and Fas-induced apoptosis in Burkitt's lymphoma Raji cells (4).

PA was first isolated from *Penicillium puberulum* Banier (1), and has also been reported to be produced by various other species of *Penicillium* sp. including *P. aurantiocandidum*, *P. aurantiogriseum*, *P. carneum*, *P. tulipae*, *P. freii*, *P. puberulum*, *P. melanoconidium*, *P. neoehinulatum*, *P. polonicum*, *P. brasilarum*, *P. radicicola*, *P. roqueforti*, *P. cyclopium* and *P. viridicatum*, (6, 12, 23, 28). However species of *P. cyclopium* series are perhaps the most important producers of PA. PA is also produced by a few *Aspergillus* sp. namely *A. ochraceus*, *A. wentii*, *A. sclerotiorum*, *A. melleus*, *A. alliaceus*, *A. sulphureus*, *A. ostianus*, *A. sclerotiorum*, and the marine species *Aspergillus ostianus* (2, 10, 16, 21). PA has also recently been reported to be produced by the keratinophilic fungus *Malbranchea aurantiaca* (19). Large quantities of PA has also been reported to be produced in silage at low temperature (1 to 10°C), in blue-eye disease corn caused by *P. martensii* (6). PA can occur as keto or lactone form (Fig. 1) (7). It was known as a tetraketide derived from orsellinic acid. The biosynthetic pathway proposed for PA is similar to that of patulin (27), however, no gene responsible for the biosynthesis of PA was characterized so far.

In this report, we describe the characterization of a polyketide synthase (P'KS) gene *aomsas* involved in the PA biosynthetic pathway in *A. ochraceus* NRRL 3174. The mutant *A. ochraceus* MINCUN109 in which *aomsas* was disrupted could not produce PA, orsellinic acid but also asperlactone and isoasperlactone (Fig. 1), two pentaketides produced by *A. ochraceus* (2, 32).

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Fungal strains and culture conditions**

*A. ochraceus* NRRL 3174 was grown for sporulation at 25°C on potato dextrose agar (Difco, Fisher Labosi) for 7 days. Spores were collected using a solution of 0.01% (v/v) Tween 80 (Fisher Labosi), and stored at -20°C in 25% (v/v) glycerol (Fisher Labosi) before

use. Conidia were inoculated (density  $\sim 10^6$ /ml) into 250-ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml synthetic medium (SAM) at 25°C, without shaking. The composition of SAM (per liter of distilled water) was: 3 g  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (Acros), 26 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (Acros), 1 g KCl (Acros), 1 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Acros), 10 ml mineral solution (of the following composition, per liter of distilled water: 70 mg  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  (Sigma), 50 mg  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (Sigma), 1000 mg  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Riedel-de Haën), 30 mg  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (Prolabo), 11 mg  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (Prolabo), 1760 mg  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Fisher Labosi), and 50 g glucose (Fisher Labosi). The pH of the medium was adjusted to 6.5 by the addition of 2 N HCl. Samples were removed every day for 17 consecutive days. Mycelium was harvested by filtration through a 0.45 $\mu\text{m}$  filter (Millipore) frozen in liquid nitrogen and then stored in -80°C before nucleic acids extraction. Filtered medium was used to extract PA. For dry weight determination, mycelium was dried overnight in oven at 100°C.

### **Extraction of secondary metabolites**

30ml filtrate samples were acidified with 200  $\mu\text{l}$  of 12 N HCl, mixed with 20 ml chloroform and vigorously shaken for 10 min. The solvent was then decanted, dried under vacuum and redissolved in 0.5 ml methanol. 20  $\mu\text{l}$  of the sample was then further analysed by HPLC.

### **High-performance liquid-chromatography (HPLC) analysis**

The HPLC apparatus consisted of a solvent delivery system and with both fluorescence ( $\lambda_{\text{ex}} = 332 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 466 \text{ nm}$ ) and UV detectors. The analytical column used was a 150 x 4.6 mm Uptisphere 5  $\mu\text{m}$  C18 ODB fitted with a guard column of 10 x 4 mm. The mobile phase consisted of a mixture of HPLC grade acetonitrile/water/acetic acid (100/99.8/0.2) at a flow rate of 1 ml/min and the column temperature was 30 °C. Kroma 3000 (BIO-TEK) was the data acquisition system. Injections were done with an auto-injector (BIO-TEK, Milan, Italy) and the injection volume was 20  $\mu\text{l}$ . The elution was at a flow rate of 1ml/min for 45 min. Elution phase used was acetonitrile (B) and acetic acid in

water 0.2% (A). The sample was eluted with a linear gradient from 10% to 50% of B over the first 30 min followed by a linear gradient to 90% of B from 30 to 35 min and then a steady flow of 90% of B through 8 min and then reduced to 10% of B through 2 min.

Secondary metabolites of *A. ochraceus* were detected by comparing the elution time and maximum absorption of UV with the standards. Isoasperlactone (maximum absorption  $\lambda_{\max} = 220$  nm) was released at 5min 30sec, asperlactone ( $\lambda_{\max} = 220$  nm) at 7min 30sec, PA ( $\lambda_{\max} = 227$  nm) at 10min 50 sec, and orsellinic acid ( $\lambda_{\max} = 215; 260$  and  $305$  nm) at 12 min.

### **Nucleic acids extraction**

Genomic DNA was extracted by using lysing enzyme and proteinase K as previously described (9). Total RNA was extracted from *A. ochraceus* NRRL 3174 using the Tri-reagent (Euromedex) which included the following steps: 200 mg of mycelia was homogenized in 1 ml of Tri reagent by using a Ultra-Turax. After 5 min at room temperature, 0.2 ml of chloroform was added to the homogenized samples, vigorously vortexed, stored for 10 min at room temperature and then centrifuged at  $15000 \times g$  for 15 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . The aqueous phase containing RNA was transferred into a microcentrifuge tube and 0.5 ml isopropanol (Euromedex) was added for RNA precipitation at room temperature (15 min). The RNA was pelleted by centrifuging at  $12000 \times g$  at  $4^{\circ}\text{C}$  for 15 min, washed with 1 ml of 75% ethanol then air-dried and dissolved in 50  $\mu\text{l}$  of 0.1% Diethylpyrocarbonate (DEPC) (Sigma) water. The quality and quantity of RNA was checked by the  $\text{DO}_{260/280}$  ratio and agarose (Fisher Labosi) gel electrophoresis according to standard protocols (26).

### **RT-PCR reaction**

For RT-PCR, total RNA was treated with DNase I (Promega) to remove DNA contamination. cDNA was synthesized from each sample with Advantage RT-for-PCR Kit (BD Biosciences) according to the supplier's manual. The expression of the *A. ochraceus*

NRRL 3174 *aomsas* gene was examined by using RT-PCR with two specific primers AoLC35-2L et AoLC35-2R designed from KS domain of the *aomsas* gene (Table 1).

PCR was performed with the *Taq* recombinant polymerase (Invitrogen, USA). Amplification was carried out in a 50 µl reaction mixture containing: 5 µl of *Taq* polymerase 10X buffer, 1,5 µl of 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µl of dNTP 10 mM of each (Promega), 1 µM of each primer, 1.5 U of *Taq*, about 200 ng of DNA genomic, H<sub>2</sub>O up to 50 µl. Reaction conditions were: 94°C for 4 min, (94°C for 45 sec, 53°C for 45 sec and 72°C for 1 min) x 30 cycles followed by an incubation at 72°C for 10 min. The amplified products were examined by 1% (w/v) agarose (Promega) gel. The PCR products were cloned into pCR2.1-Topo vector (Invitrogen) according to the supplier's instructions. Sequencing of the fragments was performed by Genomexpress (Grenoble, France)

The 5' and 3' regions of the *aomsas* gene were cloned by using the RACE-PCR kit (Invitrogen) and the protocol recommended by the manufacturer.

### **Mutant construction**

The *aomsas* gene was disrupted by inserting the *E. coli* hygromycin B phosphotransferase gene (*hph*) flanked by *A. nidulans trpC* promoter and terminator sequences (8) from plasmid pID21 (31). The transformant construction is described in Fig. 5. A 2 kb fragment of the *aomsas* gene containing the *SalI* restriction enzyme was amplified by PCR then cloned into pCR2.1-Topo vector. The plasmid TopoMS was restricted using *SalI* and then ligated to 2.2 kb of the *hph* gene cassette generated from pID2.1 vector to produce plasmid TopoMS2.1.

*A. ochraceus* protoplasts were prepared and transformed with TopoMS2.1 as previously described by O'Callaghan *et al.* (2003). The lysing enzyme (Sigma) was used at 40 mg/ml. Hygromycin-resistant transformants were selected on YES medium (20 g/l of yeast extract (Difco), 1 M sucrose (Fischer)) supplemented with 150 µg/ml of hygromycin B (Calbiochem). Transformant plates were incubated at room temperature for 24 h and then at 30°C for 4 days. Approximately 30 transformants were obtained per microgram of plasmid DNA. Putative transformants were replicated onto hygromycin-supplemented PDA plates for further analysis.



## Screening of transformants

The presence of the hygromycin resistance gene cassette in transformants was first checked by using PCR approach including two *hph* gene specific primer hph2R and hph2F (Table 1). Hygromycin PCR positive transformants were then subjected to a second PCR using the *hph* specific primer (hph2F, Table 1) and the *aomsas* gene specific primer (MSdR, Table 1). Positive PCR transformants were then inoculated into synthetic medium in order to analyse secondary metabolites production by these mutants, using HPLC.

## Data analysis

The deduced amino acid sequence was determined using the <http://www.expasy.org/tools/dna.html> site while protein-protein Blast (Blastp) searches were conducted at the GenBank database: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. The alignments were conducted using the website <http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>.

## Sequence accession number

The sequence obtained was deposited in Genbank under the accession number AY540947.

## RESULTS

### Cloning of polyketide synthase gene in *A. ochraceus* NRRL 3174 by using “gene-walking” strategy

The degenerated primer pair LC3/LC5c, previously designed for ketosynthase (KS) domains of MSAS type PKSs (5), were used to isolate putative PKS gene involved in PA

biosynthesis. PCR on genomic DNA of *A. ochraceus* with these primers amplified successfully one KS domain sequence of 700 bp (Fig. 2A), which displayed a high identity to KS domains of MSAS type PKSs characterized. For example, 68% identity to the PKS involved in the 6-methylsalicylic acid synthesis (6MSAS) in *Byssoschlamys nivea* (Genbank N° AAK48943), 66% to pksM of *A. terreus* (AAC49814), 65% to pksL2 of *A. parasiticus* (AAC23536). Alignment of the amino acid sequences of pksM, pksL2 and 6MSAS revealed two conserved regions, GVSAMGFPW and GVVHAAGV which were used to design two degenerated primers, MS2 and MS4 respectively (Fig. 2B). The specific primers MS1 (Table 1), placed at the end of Aomsas-KS domain, and MS2 allowed by PCR to span 2 kb downstream the 3' extremity of the gene. Using the same strategy, we sequenced the next 1.3 kb of the *aomsas* gene (Fig. 2B and C). The 5' and 3' extremity portions were amplified and sequenced by using RACE-PCR technique on cDNA with primers MS3 and MS4 (Fig. 2C).

The size of complete sequence of *aomsas* is 5298 bp which displayed a unique open reading frame (ORF) of 1766 amino acids. The Aomsas amino acid sequence showed about 48-52% identity to PKSs involved in the 6-methylsalicylic acid synthesis of *B. nivea* (AAK48943), *A. terreus* (AAC49814), and *P. griseofulvum* (CAA39295). Aomsas has also a significant identity (40%) with the PKS (T30871) responsible for orsellinic acid biosynthesis in *Streptomyces viridochromogenes*. Like other fungal MSAS characterized, the deduced amino acid sequence Aomsas contained the five functional domains characteristic of a fungal type I PKS. These domains were (from N terminus to C terminus)  $\beta$ -ketoacyl synthase (KS), acyltransferase (AT), dehydratase (DH),  $\beta$ -ketoacyl reductase (KR), and an acyl carrier protein (ACP) (Fig. 3). No thioesterase domain was detected.

### **PA production and *aomsas* gene expression**

The growth of *A. ochraceus* presented two phases (Fig. 4A). The first one had been occurred as exponential between day 3 and 9 followed by the second one which had been occurred slowly between day 9 and 15. PA production seemed to be associated with development of *A. ochraceus* mycelium. It started at day 3, peaked at day 11 then decreased tightly. During the growth of *A. ochraceus* no 6-methylsalicylic acid (MSA) was detected but a very low quantity of orsellinic acid at day 8 only (data not shown). Transcription

signal of *aomsas* gene observed from day 3 onwards, stayed constant at maximum level between day 5 and 8, and then stopped after day 11. This seemed to be well correlated to PA production.

### **Disruption of *aomsas* gene in *A. ochraceus***

Following transformation of *A. ochraceus* with TopoMS21 vector, one hundred and twenty transformants were obtained. Forty transformants were first screened by PCR on genomic DNA with two primers hph2R/hph2F (Table 1) in order to monitor the integration of the *hph* gene in the genome of *A. ochraceus*. The PCR positive transformants which integrated hygromycin gene in the genome were checked by one other PCR using one specific primer designed from the *aomsas* gene (MSdR, Table 1) and the other one from *hph* gene (hph2F) (Fig. 6). Thirty nine transformants given positive results for two PCR were inoculated into liquid synthetic medium to check secondary metabolite production by using HPLC. All of them displayed the same HPLC profile. In comparison with the *A. ochraceus* wild-type, all these mutants could not produce PA. In addition, these mutants lost also the capacity to produce asperlactone and isoasperlactone but no difference in fungal growth, sporulation, or pigment production were observed.

## **DISCUSSION**

In spite of the remarkable structural diversity of fungal polyketides, molecular analysis of *pks* genes showed that their catalytic domains are well conserved. Based on the best conserved domain, the ketosynthase (KS) one, some sets of degenerated primers were designed to amplify this domain from fungal PKSs (5, 18, 22).

In a previous work (data unpublished), we found that *A. ochraceus* NRRL 3174 produced penicillic acid, orsellinic acid but no MSA. In *P. cyclopium*, PA was known to be biosynthesized from the tetraketide orsellinic acid which is well related to MSA both at chemical structure and genetic level (15, 27). That is why we used the LC3/LC5c primers, previously designed for MSAS type PKSs (4), to clone *pks* gene of PA in *A. ochraceus* NRRL 3174. Sequencing of PCR product revealed only one ORF which was closely

clustered with other KS domains from MSAS-type PKSs found in Genbank. Using degenerated primers based on the high similarity observed with other PKSs in this group, we amplified successfully, in combination with RACE-PCR, the whole of this gene.

Blastp and phylogenetic analysis showed that the predicted translation product of the *aomsas* gene contains five putative functional domains: KS, AT, DH, KR and ACP (from N to C terminus) (Fig. 3), and was closely related to fungal MSAS (up to 52% identical amino acid). Alignment of other MSAS characterized with Aomsas did not detect any putative mutation in catalytic domains of the later. The expression of *aomsas* gene was also investigated. The induction of this gene seem be coupled with PA production of *A. ochraceus* (Fig. 4). We detected also the presence of several other polyketides, orsellinic acid, asperlactone, isoasperlactone, xanthomegin, viomellein, and ochratoxin A (data not shown) in the culture of *A. ochraceus* NRRL 3174 but not MSA. The transitory presence of orsellinic acid (at day 8 only) was probably due to its intermediary role in the biosynthesis of PA.

We knocked out the *aomsas* gene in *A. ochraceus* NRRL 3174 through insertional inactivation with the *E. coli* hygromycin B phosphotransferase gene (*hph*). Although no morphological significant visible difference with the wild-type was observed, the *A. ochraceus* MINCUN109 mutant lost the capacity to produce PA, orsellinic acid, asperlactone and isoasperlactone (Fig. 7), indicating a functional role for the *aomsas* gene not only in the biosynthesis of PA but also in asperlactone and isoasperlactone. Probably asperlactone and isoasperlactone are derived from the biosynthesis pathway of PA.

PA and patulin are produced by different fungal species, however, their biosynthetic pathway are similar. MSA and orsellinic acid, precursors of PA and patulin respectively, are both aromatic compounds derived from one acetyl-CoA and three malonyl-CoA (3, 14, 15). In the biosynthesis of MSA, the polyketide chain is modified by a reduction and dehydration prior to internal aldol cyclization. The formation of orsellinic acid does not involve any modification of the polyketide chain, which is key difference from MSA pathway, prior to the intramolecular aldol reaction (14, 15). Various MSAS genes in fungi were characterized but no orsellinic acid synthase gene. MSAS from *P. patulum* and orsellinic acid synthase from *P. cyclopium* have both been isolated as homogeneous proteins (14, 15). The MSAS is a homotetramer with a subunit Mr of 180 000. The

orsellinic acid synthase subunit has a lower Mr of 130 000 reflecting presumably the absence of the reductase and dehydratase activities (14, 15). In *S. viridochromogenes*, orsellinic acid synthase gene was characterized (13). This contained only four active domains, KS, AT, DH and ACP, and shown to be related to fungal MSAS gene (~37% identity) (13). Hence bacterial orsellinic acid gene is shorter than fungal MSAS gene due the lack of KR domain. Although the MSAS needs NADH for its reduction activities to form MSA, no formation of orsellinic acid by this enzyme was detected in absence of NADH (14). In *A. ochraceus*, another polyketide synthase gene of MSAS type was identified (11). However, this is very highly clustered to pksL2 of *A. parasiticus* (until 96% of identity) while Aomsas displayed only 46% of identity to the later. This suggested existence of one particularity for Aomsas.

In *A. ochraceus*, we did not detect MSA but PA and orsellinic acid. When the *aomsas* gene was disrupted, no production of those compounds was detected. Hence, the *aomsas* gene plays a key role in the biosynthesis of PA.

Asperlactone and isoasperlactone are two isomeric pentaketides produced by *A. ochraceus* and *A. melleus*. It has been suggested that they derive from a common biosynthetic precursor, a diepoxy intermediate (30). In this study, inactivation of the *aomas* gene caused the inability to produce asperlactone and isoasperlactone of *A. ochraceus* MINCUN109 suggesting that intermediates generated from *aomsas* gene serve as precursors in their biosynthesis.

Many details on the function of PKSs were not clarified. This work is the first report about the control of more than one polyketide pathway by the same PKS, the *aomsas* in *A. ochraceus*.

## References

1. Alsberg, C. L., and O. F. Black. 1913. Contribution to the study of maize deterioration. U. S. Dept. Agr. Bur. Plant Ind. Bull. 270.
2. Awad, G., F. Mathieu, Y. Coppel, and A. Lebrihi. 2005. Characterization and regulation of new secondary metabolites from *Aspergillus ochraceus* M18 obtained by UV mutagenesis. Can. J. of Microbiol. 51(1): 59-67.
3. Axberg, K., and S. Gatenbeck. 1975. The enzyme formation of penicillic acid. FEBS letters. 54(1): 18-20.
4. Bando, M., M. Hasegawa, Y. Tsuboi, Y. Miyake, M. Shiina, M. Ito, H. Handa, K. Nagai, and T. Kataoka. 2003. The mycotoxin penicillic acid inhibits fas ligand-induced apoptosis by blocking self-processing of caspase-8 in death-inducing signalling complex. J. Biol. Chem. 278: 5786-5793.
5. Bingle, L. E., T. J. Simpson, and C. M. Lazarus. 1999. Ketosynthase domain probes identify two subclasses of fungal polyketide synthase genes. Fungal Genet. Biol. 26: 209-223.
6. Ciegler, A., and C. P. Kurtzman. 1970. Penicillic acid production by blue-eye fungi on various agriculture commodities. Appl. Microbiol. 20 (5): 761-764.
7. Cole, R. J., M. A. Schweikert and B. B. Jarvis. 2003. Handbook of Secondary Fungal Metabolites. Ed. Academic Press. p 778.
8. Cullen, D., S. A. Leong, L. J. Wilson, and D. J. Henner. 1987. Transformation of *Aspergillus nidulans* with the hygromycin-resistance gene, *hph*. Gene. 57:21-26.
9. Dao, H. P., F. Mathieu, and A. Lebrihi. 2005. Two primer pairs to detect OTA producers by PCR method. International J. of Food and Microbiol. In press.
10. Davis, N.D. and U.L. Diener. 1987. Mycotoxins. p. 517-570. In L.R. Beuchat (ed.), Food and Beverage Mycology. Van Nostrand, New York.
11. Edwards, S. G., J. O'Callaghan, and A. D. W. Dobson. 2002. PCR-based detection and quantification of mycotoxigenic fungi. Mycol. Res. 106: 1005-1025.
12. Frisvad, J.C., Smedsgaard, J., Larsen, T.O. and R.A. Samson. 2004. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium* 49, 201-243. In J.C., Frisvad and R.A. Sampson (ed.), A guide to identification of food and air-borne

terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. Studies in Mycology (Utrecht). Centraalbureau voor Schimmelcultures, The Netherlands.

13. Gaisser, S., A. Trefzer, S. Stockert, A. Kirschning, and A. Bechthold. 1997. Cloning of an avilamycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces viridochromogenes* Tü57. J. of Bacteriol. 179 (20):6271-6278.

14. Gaucher, G. M., and M. G. Shepherd. 1968. Isolation of orsellinic acid synthase. Biochem. And Biophys. Res. Com. 32(4): 664-671.

15. Jordan, P. M., and J. B. Spencer. 1993. The biosynthesis of tetraketides: enzymology, mechanism and molecular programming. Biochem. Soc. Transactions. 21: 222-228.

16. Kang, S.W. and S.W. Kim. 2004. New antifungal activity of penicillic acid against *Phytophthora* species. Biotechnol. Letts. 26 : 695-698.

17. Keblyls, M., Bernhoft, A., Hofer, C.C., Morrison, E., Larsen, H.J.S. and A. Flaoyen. 2004. The effects of the *Penicillium* mycotoxins citrinin, cyclopiazonic acid, ochratoxin A, patulin, penicillic acid and roquefortine C on in vitro proliferation of porcine lymphocytes. Mycopathologia 158: 317-324.

18. Lee, T., S. H. Yun, K. T. Hodge, R. A. Humber, S. B. Krasnoff, G. B. Turgeon, O. C. Yoder, and D. M. Gibson. 2001. Polyketide synthase genes in insect- and nematode-associated fungi. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56:181-187.

19. Martinez-Luis, S., M.C. Gonzalez, Ulloa, M. and R. Mata. 2005. Phytotoxins from the fungus *Malbranchea aurantiaca*. Phytochemistry 66: 1012-1016.

20. Michito, T., I. Yoichi, and M. Hisae. 1996. Herbicide. Japan Patent 08-053310.

21. Namikoshi, M., Negishi, R., Nagai, H., Dmitrenok, A. and H. Kobayashi. 2003. Three new chlorine containing antibiotics from a marine derived fungus *Aspergillus ostianus* collected in Pohnpei. J. Antibiot. 56 : 755-761.

22. Nicholson, T. P., B. A. M. Rudd, M. Dawson, C. M. Lazarus, T. J. Simpson, and R. J. Cox. 2001. Design and utility of oligonucleotide gene probes for fungal polyketid synthases. Chem. and Biol. 8: 157-178.

23. Nielsen, K. F., and J. Smedsgaard, 2003. Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography-UV- mass spectrometry methodology. J. Chromatogr. A. 1002: 111-136.

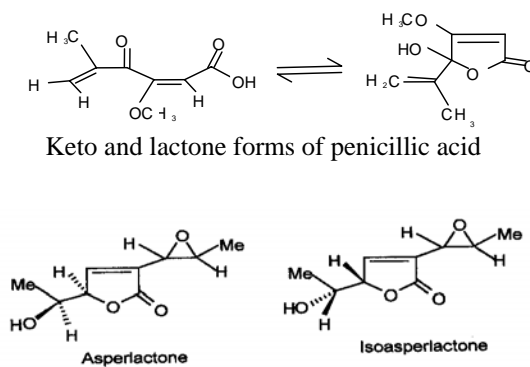
24. O'Callaghan, J., M. X. Caddick, and A. D. W. Dobson. 2003. A polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus*. *Microbiol.* 149: 3485-3491.
25. Rudong, S., H. Anke, M. Stadler, and O. Sterner. 1996. Papyracillic acid, a new PA analogue from the ascomycete *Lachnum papyraceum*. *Pergamon.* 52(30): 10249-10254.
26. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor laboratory press.
27. Sekiguchi, J., S. Katayama, and Y. Yamada. 1987. 6-Methyl-1,2,4-Benzenetriol, a new intermediate in Penicillic acid biosynthesis in *Penicillium cyclopium*. *App. Environ. Microbiol.* 1531-1535.
28. Smith, J. E., and M. O. Moss. 1985. *Mycotoxins: formation, analysis and significance*. John Wiley and Sons, Chichester, United Kingdom.
29. Sorensen, W.G. and J. Simpson. 1986. Toxicity of penicillic acid for rat alveolar macrophages in vitro. *Environ. Res.* 41: 505-513.
30. Staunton, J., and A. C. Sutkowski. 1991. <sup>17</sup>O NMR in biosynthetic studies: aspyrone, asperlactone and isoasperlactone, metabolites of *Aspergillus melleus*. *J. Chem. Soc. Commun.* 1106.
31. Tang, C. M., J. Cohen, and D.W. Holden. 1992. An *Aspergillus fumigatus* alkaline protease mutant constructed by gene disruption is deficient in extracellular elastase activity. *Molecular Microbiol.* 6:1663-1671.
32. Torres, M., M. Balcells, N. Sala, V. Sanchis, and R. Canela. 1998. Bactericidal and fungicidal activity of *Aspergillus ochraceus* metabolites and some derivatives. *Pesticide Science.* 53: 9-14.



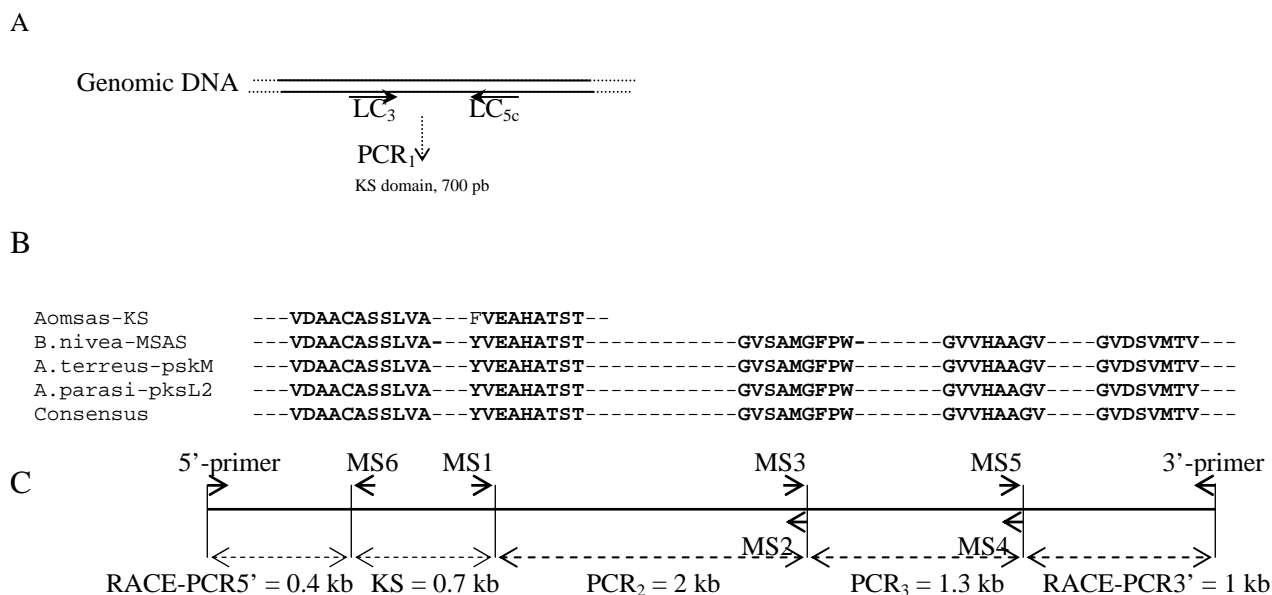
**Table 1.** Oligonucleotides used for PCR and RT-PCR

Primer name	Sequence (5'-3')
LC3	GCIGA(A/G)CA(A/G)ATGGA(T/C)CCICA
LC5c	GTIGAIGTIGC(G/A)TGIGC(T/C)TC
MS1	GCCGCCGGCGTTGACCCGATGAC
MS2	CCCATIGCTG(T/C)IACIAGICC
MS3	CTTAGCAAATCATTACCATGGAC
MS4	A(A/G)ICCIGCGCRTGACIACICC
MS5	ATCCAAACGCTAGACCAACTCGGC
MS6	CATTTTCGATCGCCTGCCATGCC
MSdR	CCGATCGTGTTTCAGATCTTGACCTTCCTGATG
MSdL	ACTAAGTTGGGGATGTCCTGAGATGACGAGA
AoLC35-2L	CTGGAGGATCTCGCTGATGT
AoLC35-2R	TTTGATCGACCATTGTGTGC
hph2F	CGGGGGCAATGAGATATGAAAAAG
hph2R	GAACCCGCTCGTCTGGCTAAG

I: Inosine



**Fig. 1.** Structure of penicillic acid, asperlactone and isoasperlactone



**Fig. 2.** Cloning of the *aomsas* gene in *A. ochraceus* NRRL 3174 using “gene walking” strategy.

A: Amplification of KS domain by using two degenerated primers LC3/LC5c targeting fungal PKSs of MSAS-type.

B: Alignment of KS domain sequence of Aomsas with other PKSs characterized of MSAS-type. Two degenerated primers MS2, MS4 were designed from conserved regions GVSAMGFP and GVVHAAGV respectively.

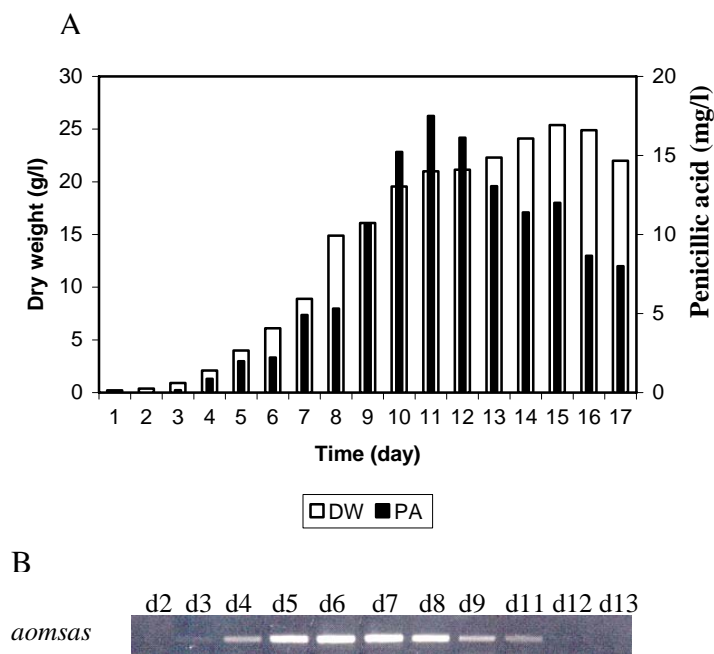
C: Scheme of primer combination used to sequence the whole of *aomsas* gene by PCR and RACE-PCR (kit supplied by Invitrogen with 5'-primer and 3'-primer).

	KS	AT	DH
<i>A. ochraceus</i> -MSAS	..GPSVSVDAACASSLVAV.....	..AVIGHSVGEIAASVV.....	..KPFPGSHPVMGTEI.....
<i>A. terreus</i> -pksM	..GPSTAVDAACASSLVAI.....	..AVIGHSVGEIAASVA.....	..KPFPGSHPLHGTEI.....
<i>A. parasiticus</i> -pksL2	..GPSTAVDAACASSLVAI.....	..AVIGHSVGEIAASVA.....	..KPFPGSHPLHGTEI.....
<i>P. patulum</i> -MSAS	..GPSTAVDAACASSLVAI.....	..AVIGHSVGEIAASVV.....	..KPFPGSHPLHGSEI.....
Consensus	..GPStaVDAACASSLVai.....	..AVIGHSVGEIAASVv.....	..KPFPGSHPlHGSEI.....

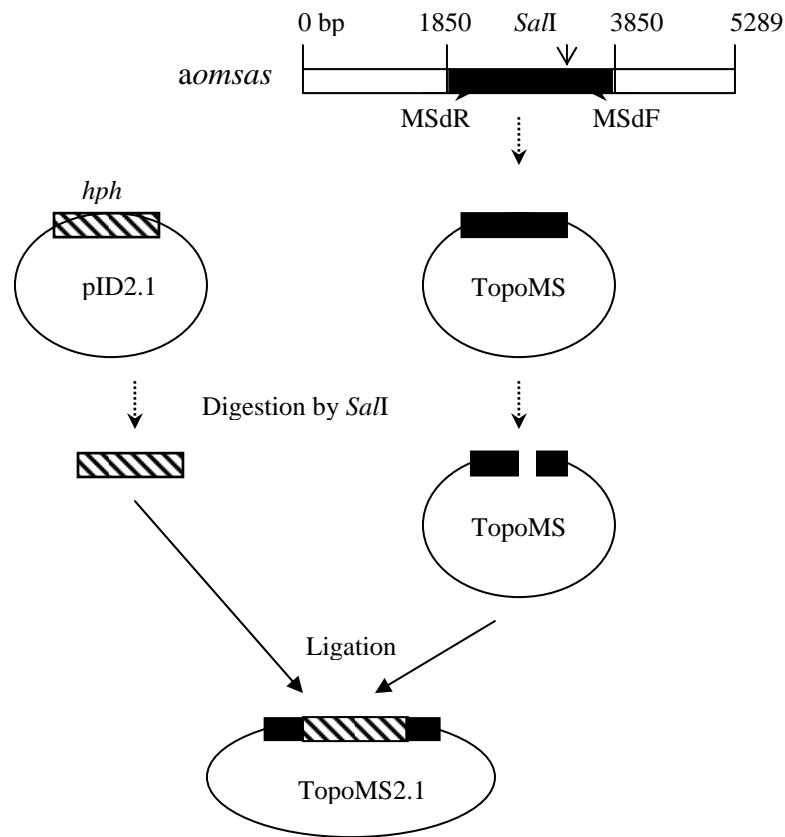
  

	KR	ACP
<i>A. ochraceus</i> -MSAS	.....LGLPTVQGvvHAAGVLE.....	.....LADMGMDSVMTTVLRRQL.....
<i>A. terreus</i> -pksM	.....LSLPPVRGVVHAAGVLD.....	.....LSDLGVDSVMTVSLRGQL.....
<i>A. parasiticus</i> -pksL2	.....LCLPPIRGVVHAAGVLH.....	.....LSNMGMDSVMTVHLRGRL.....
<i>P. patulum</i> -MSAS	.....LSLPSVQGVVHAAGVLD.....	.....LADLGVDsvMTVTLRRQL.....
Consensus	.....L.LP.vqGVVHAAGVL.....	.....Lad.GmDSVMTv.LRrql.....

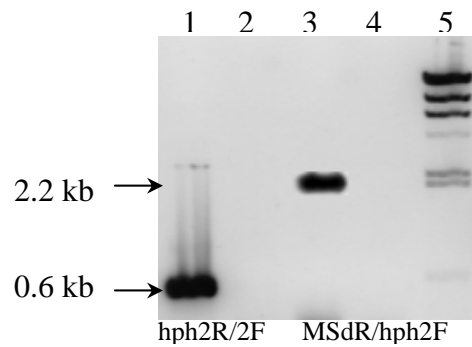
**Fig. 3.** Alignment of KS, AT, DH, KR, and ACP domains of the Aomsas sequence in *A. ochraceus* NRRL 3174 with other fungal MSAS-type PKSs.



**Fig. 4.** Kinetic production of penicillic acid (PA) in a growing culture of *A. ochraceus* at 25°C in synthetic medium (A) and profile of *aomsas* expression by RT-PCR (B).



**Fig. 5.** Construction of transformant vector



**Fig. 6.** PCR screening of *A. ochraceus* transformants. One PCR product of 0.6 kb (lane 1) obtained with primers hph2R/hph2F from the *hph* gene and one 2.2 kb product (lane 3) with MSdR/hph2F confirmed the integration of the gene *hph* in *A. ochraceus* MINCUN109. No product was amplified in *A. ochraceus* wild-type with hph2R/hph2F (lane 2) and MSdR/hph2F (4). Lane 5: size markers (Promega)

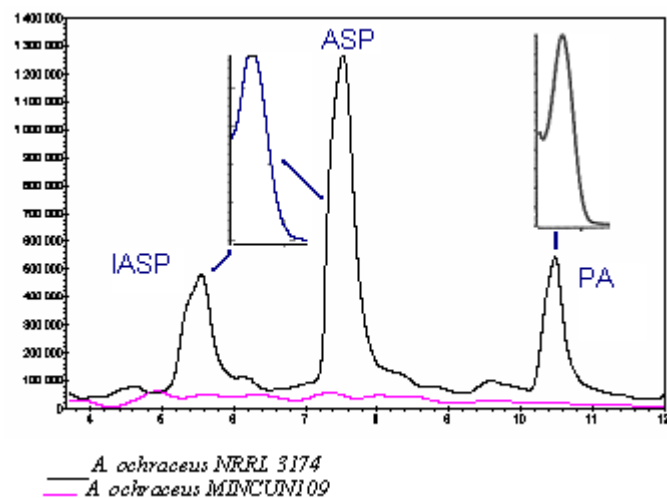


Fig. 7. HPLC traces of *A. ochraceus* NRRL 3174 and the *A. ochraceus* MINCUN109 mutant cultures and UV spectra of isoasperlactone (IASP), asperlactone (ASP) and penicillic acid (PA).

## **CHAPITRE IV. Développement d'amorces spécifiques pour la détection rapide des champignons producteurs d'OTA et de citrine**

## **Chapitre IV. Développement d'amorces spécifiques pour la détection rapide des champignons producteurs d'OTA et de citrinine**

### **Introduction**

Presque tous les aliments destinés à l'homme ou à l'animal peuvent être contaminés par les microchampignons. On a estimé que 25% environ de la production annuelle des denrées dérivées de plantes sont altérées par les moisissures. Plusieurs moisissures filamenteuses sont capables de produire des mycotoxines qui sont connues responsables de certaines épidémies comme par exemple la néphropathie endémique dans la région des Balkans liée aux champignons producteurs d'ochratoxine A (Krogh, 1987) ou encore l'ergotisme lié à la consommation de produits alimentaires contaminés par l'ergotoxine alcaloïde (*Claviceps purpurea*) (Barger, 1931).

Les mycotoxines sont de nos jours une préoccupation permanente pour les industriels impliqués dans le domaine agro-alimentaire. En effet la commission européenne élabore de plus en plus de normes concernant la présence de mycotoxines dans les produits alimentaires ainsi que dans la matière première. Ainsi, ces dernières années nous avons vu apparaître des valeurs seuils à respecter. Par exemple pour l'OTA, elles sont de 10 µg/kg dans le raisin sec et 0,5 µg/kg dans les aliments infantiles.

Aujourd'hui les seules techniques disponibles pour l'évaluation des risques liés à la présence des mycotoxines sont celles qui permettent le dosage direct des mycotoxines présentes. Ces techniques sont diverses et variées comme la chromatographie en couche mince (TLC), la chromatographie liquide haute performante (HPLC) avec détection en fluorimétrie, l'électrophorèse capillaire, la chromatographie en phase gazeuse (CPG) avec spectrométrie de masse ainsi que les immuno-essais (Pittet et Royer, 2002). Or, lorsque la mycotoxine est produite, il est trop tard. En effet très peu de procédés disponibles sont capables d'éliminer ces mycotoxines sans altérer les produits alimentaires ou les matières

premières car ces composés sont souvent résistants aux traitements chimique et thermique (Olsen *et al.*, 2003). Dans le cadre d'une gestion s'appuyant sur la prévention, il serait primordial d'évaluer le nombre de champignons toxigènes présents, à un moment donné, dans la matière.

La détection des champignons par dénombrement sur boîtes de Petri suivie d'une identification et d'une classification ainsi que de la détermination du pouvoir toxigène sont laborieuses, longues et nécessitent une expérience confirmée dans la taxonomie des champignons (Gams et Niregberg, 1989). Les méthodes immunologiques, basées sur les antigènes de surfaces, et la détermination de la quantité d'ergostérol présent dans l'échantillon par des méthodes analytiques ne sont pas spécifiques aux champignons toxigènes (Saxena *et al.*, 2001 ; Pittet et Royer, 2002).

Ces problèmes peuvent être résolus par l'utilisation de la méthode PCR, qui réduit le temps de détection de quelques jours en quelques heures et qui permet de détecter de façon précoce la contamination potentielle des produits alimentaires par des mycotoxines . Ces méthodes moléculaires se basent sur l'amplification de régions particulières du génome de l'organisme potentiellement producteur et elles peuvent être utilisées pour la quantification des microorganismes. Elle sont rapides, relativement moins chères et automatisables. C'est le cas de la détection et de la quantification d'un certain nombre de bactéries pathogènes comme *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Clostridium perfringens*, *Listeria*, *Bacillus cereus*, etc. (Hansen *et al.*, 2001) et des champignons producteurs d'aflatoxines, patuline, fumonisine (Färber *et al.*, 1997 ; Edwards *et al.*, 2002 ; Marek *et al.*, 2003 ; Bluhm *et al.*, 2004). Pour développer la méthode PCR, il est indispensable de disposer d'une séquence d'ADN qui peut cibler spécifiquement les producteurs de mycotoxine. Pour cela, les gènes intervenant dans la production des toxines, et dans la virulence sont souvent utilisés (Olsen *et al.*, 1995).

Ici, notre objectif est de pouvoir détecter et par la suite quantifier un potentiel toxigène (OTA et citrinine) dans les produits alimentaires et les matières premières. Nous nous sommes particulièrement intéressés aux champignons producteurs d'OTA : *A. ochraceus*, *A. carbonarius* et *P. verrucosum*. Dans la filière céréales, on rencontre *A. ochraceus* et *P. verrucosum* plus fréquemment que d'autres champignons. En effet, *P.*



*verrucosum* est le principal producteur d'ochratoxine A dans les céréales européennes (Olsen *et al.*, 2003). Plus de 7% des grains infectés par *P. verrucosum* sont contaminés par l'OTA. Généralement, *P. verrucosum* est plus dominant à une Aw basse (0,8) à 15 ° C, tandis que *A. ochraceus* est plus dominant à une Aw plus élevée à 25 ° C. En outre, les résultats indiquent que *P. verrucosum* était moins sensible aux concentrations plus hautes de CO<sub>2</sub> qu'*A. ochraceus*, ce qui peut aussi être un avantage compétitif pendant le stockage. *A. carbonarius*, quant à lui, pose le plus de problèmes dans la filière raisin et vin (Canabes *et al.*, 2002).

Nous avons également développé des amorces pour la détection de *P. citrinum*, un producteur de citrinine. *P. citrinum* a été isolé à partir d'orge, riz et certaines autres céréales (Comerio *et al.*, 1998). Ainsi dans plusieurs denrées alimentaires, on peut détecter à la fois l'OTA et la citrinine ainsi que leurs champignons producteurs.

Pour atteindre l'objectif fixé, il faut chercher dans un premier temps, des séquences d'ADN ciblant ces champignons choisis, et ensuite les amorces spécifiques sont fabriquées puis validées par PCR. Pour *A. ochraceus*, nous avons utilisé la séquence PKS responsable de la production d'OTA, AoLC35-12 qui a été trouvée dans la première partie de ce travail de thèse.

## Résultats et Discussion

### 1. Détection du producteur de citrinine, *P. citrinum*

L'amplification par PCR avec le couple d'amorces dégénérées KS1/KS2 sur l'ADN génomique de *P. citrinum* a donné la séquence CTKS3 de 707 pb (N° AY540901). Comme attendu, la traduction de cette séquence en acides aminés correspond au domaine KS d'une PKS. Au niveau de la séquence en acides aminés, elle présente environ 63% d'identité avec les nonacétone synthases de *P. citrinum* et d'*A. terreus*. Deux amorces spécifiques CTKS3L/CTKS3R ont donc été fabriquées à partir de CTKS3 (Tableau 8). La spécificité de ces amorces a été testée par PCR sur 18 souches différentes. Seuls deux producteurs de

citrinine, *P. citrinum* et *M. monascus* ont donné des réponses positives, donc un produit de PCR de 368 pb (Tableau 9).

**Tableau 8:** Couple d'amorces utilisées pour la détection des champignons producteurs de mycotoxines par méthode PCR

Espèce	Couple d'amorces (5' - 3')	PKS ciblée/ taille du produit PCR
<i>A. carbonarius</i> M333	AcKS9L : TGCTAGCTGCGACTGGGATG AcKS9R : GGCGTTTCAGAACCACAGCA	<i>AcKS9</i> / 462 pb
	AcKS10L : TCCATCTCGCGTGTCAGAGC AcKS10R : ATCAAAGCCTCTTGCGCCAC	<i>AcKS10</i> / 373 pb
<i>A. ochraceus</i> NRRL 3174	AoLC35-12L: GCCAGACCATCGACACTGCATGCTC AoLC35-12R: CGACTGGCGTTCCAGTACCATGAGC	<i>AoLC35-12</i> / 520 pb
	AoOTAL : CATCCTGCCGCAACGCTCTATCTTTC AoOTAR : CAATCACCCGAGGTCCAAGAGCCTCG	<i>AoLC35-12</i> / 690
<i>P. citrinum</i> NRRL 1843	CTKS3L : CCTCCGTATTCGTTGGCGTC CTKS3R : AAAGCTTGCTCTCCGCAACG	<i>CTKS3</i> / 368 pb
<i>P. verrucosum</i> NRRL 3711	PvKS6L : ATCATGGCCTCGTGCGAAAT PvKS6R : CGCCCGATGGATCCTGTAAG	<i>PvKS6</i> / 406 pb
	PvKS9L : AACGGCTGCTGCTCGAGACT PvKS9R : CAGAAGGTTGGTTCCCGCTG	<i>PvKS9</i> / 301 pb
	PvKS11L : AGCGATTGCAGCGGGAAGT PvKS11R : GCCCGTGTATAGACGCTCCG	<i>PvKS11</i> / 319 pb
	PvKS15L : AGCAGCGAATTCTTCTGGA PvKS15R : CTGGTGCCGTTACGAAGGG	<i>PvKS15</i> / 254 pb

## 2. Détection du producteur d'OTA, *A. carbonarius*

L'amplification par PCR avec le couple d'amorces dégénérées KS1/KS2 sur l'ADN génomique d'*A. carbonarius* a donné deux séquences différentes, AcKS9 (780 pb, N° AY540944) et AcKS10 (710 pb, N° AY540952) correspondant à deux domaines KS différents. La séquence en acides aminés de AcKS9 montre environ 60% d'identité avec les nonacétones synthases de *P. citrinum* et d'*A. terreus* tandis que celle de AcKS10 montre 55% d'identité avec les dicétones synthases. Les deux couples d'amorces spécifiques AcKS9L/AcKS9R et AcKS10L/AcKS10R (Tableau 8) ont été fabriqués puis testés sur 18 souches fongiques (Tableau 9). Lors de l'amplification par PCR sur l'ADN de ces souches,

AoKS9L/AoKS9R donne une bande de 462 pb non seulement avec *A. carbonarius* (M333 et 2Mu134) mais également avec *A. ochraceus*. Le couple d'amorces AcKS10L/AcKS10R montre plus de spécificité en donnant un seul fragment de 462 pb avec les deux *carbonarius* testés (Tableau 9).

### 3. Détection du producteur d'OTA, *P. verrucosum*

L'amplification par PCR avec le couple d'amorces dégénérées KS1/KS2 sur l'ADN génomique de *P. verrucosum* a donné trois séquences d'environ 700 pb : PvKS6 (N°AY540901), PvKS9 (N°AY540902) et PvKS15 (N°AY540903). Comme chez *P. citrinum* et *A. carbonarius*, ces séquences codent également trois domaines KS différents. Au niveau de la séquence en acides aminés, ils présentent une identité entre 55 à 60% avec des nonacétones et dicétones synthases de *P. citrinum* et d'*A. terreus*. Les amorces spécifiques ont été fabriquées à partir de ces séquences (Tableau 8). L'amplification par PCR donne un produit spécifique, de taille attendue, à la souche *P. verrucosum* testée quelque soit le couple d'amorces utilisé (Tableau 9).

### 4. Détection du producteur d'OTA, *A. ochraceus*

Pour détecter *A. ochraceus*, la séquence AoLC35-12, la PKS de l'OTA (O'Callaghan *et al.*, 2003) a été utilisée. Lors de l'alignement de sa séquence en acides aminés avec d'autres PKS ayant les scores d'identité les plus élevés, nous avons obtenu deux régions conservées, **SQDTIDTACS** et **AHGTGTPVG** à partir desquelles les amorces spécifiques AoLC35-12L et AoLC35-12R ont été dessinées (Tableau 8). La taille de l'amplification avec ces amorces sur l'ADN génomique d'*A. ochraceus* est de 520 pb. Le deuxième couple d'amorces spécifiques AoOTAL/AoOTAR a été dessiné à partir de deux portions non conservées et couvrant l'intron de 80 pb de AoLC35-12. La taille du produit PCR avec ces amorces sur l'ADN génomique d'*A. ochraceus* est de 690 pb.

**Tableau 9.** Validation des amorces spécifiques dans la détection des producteurs d'OTA et de citrinine par méthode PCR

Espèce	Mycotoxines produites	AoLC35-12L AoLC35-12R	AoOTAL AoOTAR	AcKS9L AcKS9R	AcKS10L AcKS10R	CTKS3L CTKS3R	PvKS6L PvKS6R	PvKS9L PvKS9R	PvKS11L PvKS11R	PvKS15L PvKS15L
<i>A. carbonarius</i> M333	OTA	470 pb	-	462 pb	373 pb	-	-	-	-	-
<i>A. carbonarius</i> 2Mu134	OT A	470 pb	-	462 pb	373 pb	-	-	-	-	-
<i>A. flavus</i> INRA Toulouse ( <sup>1</sup> )	Aflatoxines	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. melleus</i> NRRL 3519 ( <sup>2</sup> )	OTA	~520 pb	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. ochraceus</i> NRRL 3174	OTA	520 bp	690 pb	~462 pb	-	-	-	-	-	-
<i>A. sulfureus</i> NRRL 4077	OTA	~520 pb	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. fumigatus</i> NCPT 13 ( <sup>3</sup> )	Glitotoxine	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. fumigatus</i> ATCC 46645 ( <sup>4</sup> )	Glitotoxine	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. nivea</i> NRRL 2615	Patuline	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>F. culmorum</i> ITCF 11 ( <sup>5</sup> )	Déoxynivalénol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>F. graminearum</i> NRRL 5883	Fumomonisine	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>F. verticillioides</i> NRRL 6442	Fumonisine	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. ruber</i> NCPT 5	Citrinine	~520 pb	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. chrysogenum</i> NCPT 74	Pénicilline	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. citrinum</i> NRRL 1843	Citrinine	~520 pb	-	-	-	368 pb	-	-	-	-
<i>P. citrinum</i> 2Mu932	Citrinine	~ 520 pb	-	-	-	368 pb	-	-	-	-
<i>P. expansum</i> NCPT 40	Patuline	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. verrucosum</i> NRRL 3711	OTA	~520 bp	-	-	-	-	406 pb	301 pb	319 pb	254pb

<sup>1</sup> : INRA : Institut National de Recherche Agronomique, France ; <sup>2</sup> : NRRL : Northern Regional Research Laboratory, Illinois, USA; <sup>3</sup> : NCPT : Numéro de Collection du laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie, France ; <sup>4</sup> : ATCC : American Type Culture Collection.

- : réponse négative, ~ : produit de taille approximative (estimation sur gel d'électrophorèse en agarose).

Ces deux couples d'amorces sont testés par PCR sur l'ADN génomique de 18 souches (Tableau 9). Avec AoLC35-12L/AoLC35-12R, un seul fragment a été amplifié à partir de l'ADN génomique des producteurs d'OTA et de citrine (Tableau 9). La taille de ce produit PCR est très presque identique, environ 520 pb pour *A. melleus*, *A. ochraceus*, *A. sulfureus*, et *P. verrucosum* (producteurs d'OTA) mais elle est légèrement plus petite chez *A. carbonarius* M333 et 2Mu134 (producteurs d'OTA), *P. citrinum* et *M. ruber* (producteurs de citrinine). En effet, le séquençage des produits PCR obtenus chez *A. carbonarius* M333 et 2Mu134 par amplification avec AoLC35-12L/AoLC35-12R ont donné deux séquences identiques de 470 pb. La traduction en acides aminés de celle-ci donne un seul cadre de lecture ouvert correspondant à un domaine KS, donc pas d'intron. Avec AoOTAL/AoOTAR, nous avons amplifié un produit de 690 pb seulement sur l'*A. ochraceus*.

La PCR a été montrée comme une technique puissante dans la détection des germes pathogènes comme *Bacillus cereus* (Hansen *et al.*, 2001), *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* (Olsen *et al.*, 1995) et des champignons toxiques sur différentes matières alimentaires comme *A. ochraceus* sur les grains de café (Schmidt *et al.*, 2004.), *P. expansum* (Marek *et al.*, 2003). Dans ce travail, les amorces AoLC35-12L/AoLC35-12R dessinées à partir des régions conservées du gène *pks* intervenant dans la synthèse d'OTA nous ont permis de détecter par PCR des producteurs d'OTA : *A. ochraceus*, *A. carbonarius* et *P. verrucosum*, et de citrinine : *P. citrinum* et *M. ruber*. Ces résultats sont intéressants car OTA et citrinine sont souvent détectées en même temps sur les céréales (Vrabcheva *et al.*, 2000). Certaines études ont déjà été menées pour détecter les producteurs de mycotoxine (aflatoxines, patuline, ochratoxine A) mais aucune n'a permis de détecter à la fois les producteurs d'OTA et ceux de citrinine (Geisen, 1996 ; Kappe *et al.*, 1996 ; Marek *et al.*, 2003 ; Geisen *et al.*, 2004). Les amorces AoOTAL/AoOTAR dessinées à partir des régions non conservées du gène de l'OTA ont permis de détecter spécifiquement *A. ochraceus*.

### **Article 3:**

**(International Journal of Food Microbiology, *In Press*)**

#### **Two primer pairs to detect OTA producers by PCR method**

Dao Huy Phong, Mathieu Florence and Lebrihi Ahmed\*

Equipe Génie des Systèmes Microbiens, Laboratoire de Génie Chimique UMR5503 (CNRS/INPT/UPS), Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse, Institut National Polytechnique de Toulouse, 1, avenue de l'Agrobiopôle, BP107, 31326 Castanet Tolosan, France.

\* corresponding author

Tel : 00 33 (0)5 62 19 39 44

Fax : 00 33 (0)5 62 19 39 01

E-mail : lebrihi@ensat.fr

#### **Abstract**

Fungi contaminating foods and feeds may produce many mycotoxins including ochratoxin A (OTA). Early and rapid detection of potential OTA producing fungi is important to reduce the negative impacts of OTA. In this study, two PCR specific primer pairs, AoLC35-12L/AoLC35-12R and AoOTAL/AoOTAR were designed from a DNA sequence of a polyketide synthase gene in *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174. On 14 different fungi tested by PCR, AoLC35-12L/AoLC35-12R amplified a unique band from either OTA or citrinin producers while AoOTAL/AoOTAR amplified one PCR product only from *A. ochraceus*. So these primers could be used to detect both OTA and citrinin producer fungi (AoLC35-12L/AoLC35-12R) or only *A. ochraceus* (AoOTAL/AoOTAR) from foodstuffs using PCR method.

Keywords: Ochratoxin A, citrinin, *Aspergillus ochraceus*, PCR, detection

## Introduction

Fungal organisms caused enormous economic problems to the public health and to the agriculture. The fungal contamination in foods and plants results in a reduction in quality and quantity (Jelinek, 1987), and/or is associated with veterinary diseases and human health risks due to their production of various natural toxic compounds such as mycotoxins including aflatoxin, patulin, ochratoxin A (OTA), citrinin (Richard and Thurston, 1986).

OTA, firstly isolated from *Aspergillus ochraceus* (Van der Merwe et al. 1965) is one of the most dangerous, widely produced by *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. and known to be nephrotoxic, hepatotoxic, teratogenic and potentially carcinogenic (Krogh, 1987; Kuiper-Goodman and Scott, 1989; Pohland, 1993). OTA and producer fungi were found on various food commodities, predominantly on cereal and derived products (Pohland et al., 1992; Wolff, 2000; Wolff et al., 2000) but also in wine (Battilani and Pietri, 2002.) and in coffee (Studer-Rohr et al., 1995; Fazekas et al., 2002). Sometimes OTA might co-occur with citrinin (Vracheva et al., 2000), a mycotoxin produced by *P. citrinum* and *Monascus ruber* (Blanc et al., 1995).

To prevent OTA in foodstuffs, it is necessary to have a rapid and specific method to detect the producing fungi early. Usual identification and quantification methods of food-borne fungi require multiple steps. Morphological and physiological tests were time-consuming and often, mycological expertise was necessary. Nowadays, many studies reported on PCR-based methods giving a more specific, sensitive and rapid detection of the target organism and can be automated (Färber et al., 1997; Geisen et al., 2004). One of the most important factors in development of such method is the reliability of the primer set designed and the targeted DNA sequence of interest organism.

In this work, we designed two sets of specific primers, AoLC35-12L/AoLC35-12R and AoOTAL/AoOTAR, from a 3.4 kb DNA sequence of a polyketide synthase (PKS) gene from *A. ochraceus* NRRL 3174. These primer sets were tested by PCR method on different genera of OTA and other mycotoxin producing fungi.

## **Materials and methods**

### **1. Fungal strains and culture conditions**

Fungal strains (table 1) were grown at 25°C on potato dextrose agar (PDA) (Difco, Fisher Labosi) during 7 days. Then spores were collected with a sterile solution of 0.1 % (v/v) Tween 80 (Fisher Labosi) and stored at -20°C in 25% (v/v) of glycerol (Fisher Labosi) before use. Conidia (about  $10^6$ /ml) were inoculated into 250-ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml of potato dextrose broth (PDB) (Difco, Fisher Labosi), at 25°C, without shaking for 3 days. The mycelium was harvested by filtration through a 0.45µm filter (Millipore) frozen in liquid nitrogen and then stored at -80°C before nucleic acid extraction.

### **2. Genomic DNA extraction**

200 mg of lyophilized mycelium were homogenized in 800 µl of lysis buffer (100 mM Tris HCl pH 7.4 (Sigma Aldrich), 20 mM EDTA (Sigma Aldrich), 250 mM NaCl (Sigma Aldrich), 2% w/v SDS (Sigma Aldrich)) by using a Ultra-Turax (Labo moderne) and incubated at 37°C for 30 min with 10 µl of 25 mg/ml RNase solution (Promega), then added with 10 µl of proteinase K (20 mg/ml, Euromedex) were added and the mixture was incubated at 65°C for 30 min. A volume of phenol-chloroform-isoamyl alcohol (v/v/v: 25/24/1) (Sigma Aldrich) was added, and the mixture was vigorously vortexed for 5 min. The aqueous phase collected after centrifugation (15,000 x g, 15 min) was extracted by an equal volume of chloroform (Prolabo). Genomic DNA was precipitated at -20°C in 2 h with two volumes of 100% ethanol (Prolabo). The DNA was pelleted by centrifuging at 15,000 x g and washed with 1 ml of 75% ethanol then dried at the room temperature. 100 µl of water was used to re-suspend genomic DNA. The quality and quantity of DNA were estimated by the  $DO_{260/280}$  ratio and agarose (Fisher Labosi) gel electrophoresis according to standard protocol (Sambrook et al., 1989).



### 3. PCR reaction

PCR was performed with the *Taq* recombinant polymerase (Invitrogen, USA). Amplification was carried out in 50 µl reaction mixture containing: 5 µl of *Taq* polymerase buffer10X, 1,5 µl of 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µl of dNTP 10 mM of each (Promega), 1 µM of each primer, 1.5 U of *Taq*, about 50 ng of DNA genomic, H<sub>2</sub>O up to 50 µl. Reaction conditions were: 94°C for 4 min, (94°C for 40 sec, 58°C for 40 sec and 72°C for 40 sec)x35 cycles followed by an incubation at 72°C for 10 min. The amplified products were examined by agarose gel electrophoresis. The *β-tubulin* gene was used as positive control and primer sequences were: TubF: ctcgagcgtatgaacgtctac; TubR: aaaccctggaggcagtcgc, which amplified a 340 bp fragment on genomic DNA.

### 4. Data analysis

We used the websites <http://www.expasy.org/tools/dna.html> to deduce the amino acid sequence from DNA sequence, and <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> for blast research at the GenBank database. The alignment was executed using the website <http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>.

## Results

### 1. Primer selection

The AoLC35-12 DNA sequence of a polyketide synthase gene from the OTA producing *A. ochraceus* NRRL 3174 was previously identified in our laboratory and published in the Genbank (Accession number: AY583208). Cloning strategy of this sequence was briefly described (Fig. 1). AoLC35-12 sequence was found to overlap the AT domain of otapks demonstrated to be involved in OTA biosynthesis by O'Callaghan et al. (2004). Alignment from database of the deduced amino acid sequence of AoLC35-12 with other fungal PKSs closely related with high identity revealed three main conserved regions in the ketosynthase domain (Fig. 2A). A first primer pair AoLC35-12L/AoLC35-12R was designed from two highly conserved regions. AoLC35-12R was made from DNA region encoding for SQTIDTACS, the active site of the KS domain, whereas AoLC35-12L was done from DNA sequence of

AHGTGTPVG (Fig. 2B). This primer pair amplified a product of 520 bp, including an intron of 80 bp from *A. ochraceus* NRRL 3174 genomic DNA. A second primer pair, AoOTAL/AoOTAR was designed from two least conserved sequences identified, HPAATLYL and SEALGPRVI, respectively in the KS domain (Fig. 2B). This set of primers amplified a product of 690 bp in *A. ochraceus* NRRL 3174. Both primer pairs were tested on 14 different fungi (Table 1) by using the PCR method.

## 2. PCR reactions

14 fungi were used for PCR test including 6 OTA producing ones (table 1). With the primers AoLC35-12L/AoLC35-12R, a unique PCR product was amplified from genomic DNA of all OTA and citrinin producers (Fig. 3A, lanes 2-9). In *A. melleus*, *A. ochraceus*, *A. sulfureus*, and *P. verrucosum*, the size of PCR products was nearly identical, about 520 bp (Fig. 3A, lane 4, 5, 6 and 7) but that in *A. carbonarius* (M333 and 2Mu134), *P. citrinum* and *M. ruber* was slightly smaller (Fig. 3A, lane 2, 3, 8 and 9). No amplification was observed from the genomic DNA of other strains tested (lanes 10 to 16).

When the set of primers AoOTAL/AoOTAR was used, only a product of 690 bp from genomic DNA of *A. ochraceus* NRRL 3174 was observed (Fig. 4, lane 6). No product was amplified on other fungi tested.

The  $\beta$ -tubulin gene was used as positive control with a fragment of 320 bp obtained in the same PCR conditions for all fungal treated DNA (e.g. for *A. carbonarius*, Fig. 3B, lane 2 and 3).

## Discussion

The PCR reaction is often used for the detection of pathogenic or toxinogenic microorganisms in various substrates, including foods (Fach et al., 1995; Hansen et al., 2001). Primers for detection of fungi in foods by PCR method were usually designed from conserved domains of ribosomal RNA (rRNA) genes of target strains, for example internal transcribed spacer (ITS) genes (Kappe et al., 1996; Zhou et al., 2000; Vanittanakom et al., 2003). Conserved domains of genes required in mycotoxin

pathway can also be used as in the case of aflatoxin (Färber et al., 1997, Sweeney et al., 2000). However, the biosynthesis pathway of OTA is not yet well understood. In *A. ochraceus*, the sequence of AoLC35-12 (Accession N°: AY583208) was found to join a sequence encoding for acyl transferase domain of a polyketide synthase, which is involved in the OTA biosynthesis pathway (O'Callaghan et al., 2003). Thus this enables its use as target sequence to detect potential OTA producers by PCR reaction.

Amplification with primers AoLC35-12L/AoLC35-12R, designed from conserved domains of KS sequence of AoLC35-12, was successful not only with all genomic DNA of OTA producing fungi, *A. carbonarius* (M333 and 2MU134), *A. melleus*, *A. ochraceus* NRRL 3174, *A. sulfureus* and *P. verrucosum* but also with genomic DNA from citrinin producing as *P. citrinum*, *M. ruber* (Fig. 3A, lane 2 to 9). A single PCR product observed from each DNA sample confirmed the specificity of this primer pair. The amplification of AoLC35-12L/AoLC35-12R with all genomic DNA of OTA and citrinin producing strains might be explained by the fact that this primer set was selected from the most conserved regions of the ketosynthase domain (SQTIDTACS and AHGTGTPVG) of AoLC35-12 sequence, a gene required for OTA production in *A. ochraceus*. This suggested the existence of similar DNA conserved domains in *P. citrinum* and *M. ruber*. These DNA conserved regions could not be present in other fungi tested, which also produced several mycotoxins (table 1) via the polyketide pathway. In addition, the PCR products from *A. carbonarius* M333 (isolated from coffee) and *A. carbonarius* 2MU134 (isolated from grape) were cloned and sequenced, and gave an identical sequence of 470 bp (Genbank accession number: AY652734). The deduced amino acid sequences displayed a high identity (about 73 %) to the KS domain of AoLC35-12 sequence in *A. ochraceus* (data not shown). No intron was found in these two sequences of *A. carbonarius* which explained the difference between the size of PCR product from *A. carbonarius* and that from *A. ochraceus*.

OTA was produced in food by three main species of fungi, *A. ochraceus*, *A. carbonarius* and *P. verrucosum*. *A. ochraceus* may be responsible for the presence of OTA in commodities such as coffee and cocoa in warmer areas whereas in temperate climates, the most important species is *P. verrucosum*, mainly associated with cereals (Pitt and Hocking, 1997). In coffee and in grape, *A. carbonarius*, which was able to produce OTA was also isolated (Taniwaki et al., 2002). Several primers were developed and were reported by other authors (Geisen, 1996; Kappe et al., 1996,

Marek et al., 2003; Geisen et al., 2004) in order to detect mycotoxigenic fungi (aflatoxin producers, patulin producers, ochratoxin) but none of them may detect both OTA and citrinin producing fungi. In cereal, citrinin contamination may co-occur with OTA (Vrabcheva et al., 2000).

Using the primer pair AoOTAL/AoOTAR designed from the non conserved region of KS domain, only one product of 690 bp was amplified on genomic DNA (Fig. 4, lane 5) as well as on cDNA (data not shown) of *A. ochraceus* NRRL 3174. Hence these primers could be used either in usual PCR or in the real-time PCR for detection and quantification of OTA producers or for evaluation of gene expression in *A. ochraceus* in different culture conditions. Recently Schmidt et al. (2004) reported the detection and quantification of *A. ochraceus* in green coffee by PCR. However the gene used is not the same as AoLC35-12.

The set primers AoOTAL/AoOTAR could be used to detect specifically *A. ochraceus* by PCR method, and AoLC35-12L/AoLC35-12R to detect OTA producing fungi, *A. carbonarius*, *A. melleus*, *A. ochraceus*, *A. sulfureus*, *P. verrucosum* and citrinin producing, *P. citrinum* and *Monascus ruber*. Further work is needed to validate their application to detect OTA producers on food stuffs such as cereals, coffee or grape.

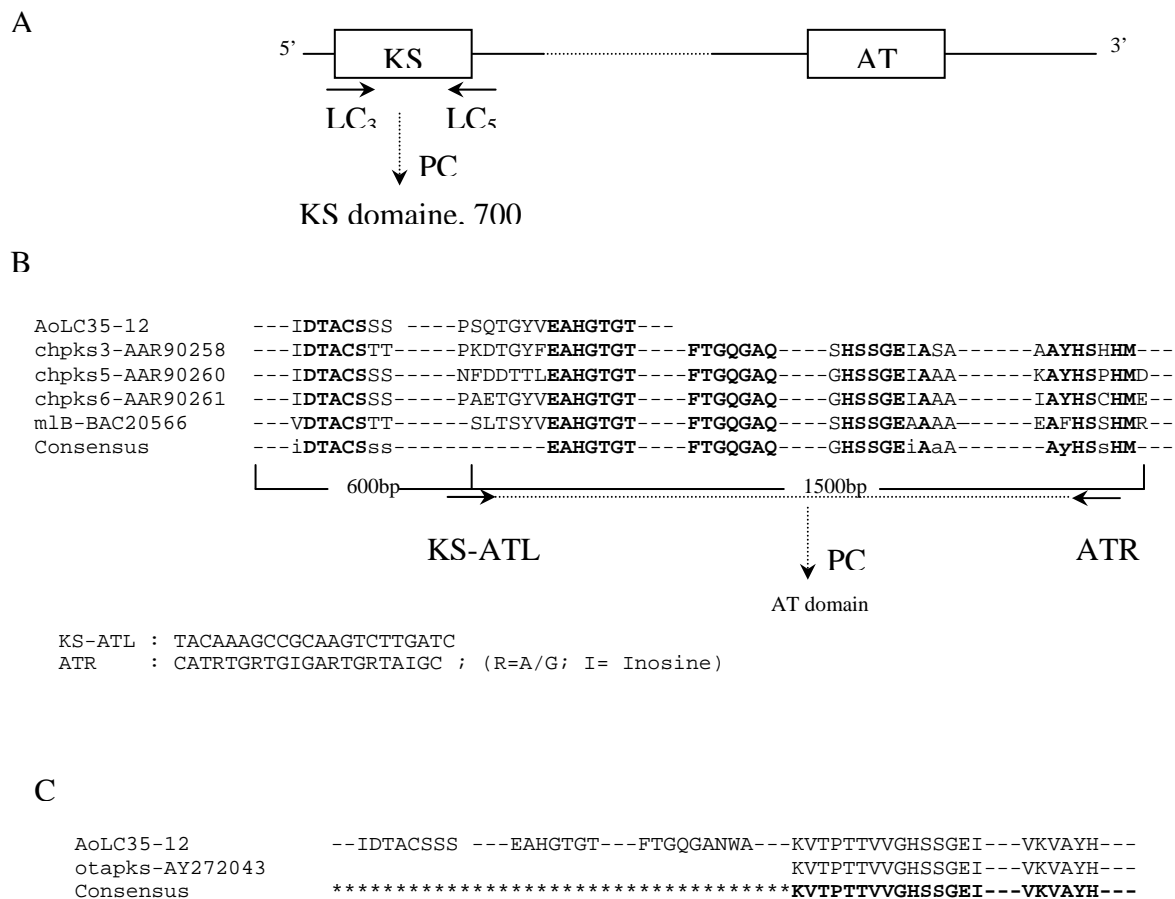
Acknowledgment: The authors thank Patricia NOUVET for her technical help.

## References

- Battilani, P., Pietri, A., 2002. Ochratoxin A in grapes and wine. *Eur. J. of Plant Pathol.* 108, 639-643.
- Bingle, L. E., Simpson T. J., Lazarus C.M.. 1999. Ketosynthase domain probes identify two subclasses of fungal polyketide synthase genes. *Fungal Genet. Biol.* 26: 209-223.
- Blanc, P.J., Laussac, J.P., Le Bars, J., Le Bars P., Loret, M.O., Pareilleux, A., Prome, D., Prome, J.C., Santerre, A.L., Goma, G., 1995. Characterization of monascidin A from *Monascus* as citrinin. *Int. J. of Food Microbiol.* 27(2-3), 201-213.
- Geisen, R., 1996. Multiplex polymerase chain reaction for the detection of potential aflatoxin and sterigmatocystin producing fungi. *Syst. and Appl. Microbiol.* 19, 388-392.
- Geisen R., Mayer Z., Karolewicz A., Färber P., 2004. Development of a Real Time PCR System for detection of *Penicillium nordicum* and for Monitoring Ochratoxin A production in foods by targeting the ochratoxin polyketide synthase gene. *System. Appl. Microbiol.* 27, 501-507.
- Fach, P., Gibert, M., Griffais, R., Guillou, J.P., Popoff, M.R., 1995. PCR and gene probe identification of botulinum neurotoxin A-, B-, E-, F- , and G-producing *Clostridium* spp. and evaluation in food samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (1), 389-392.
- Färber, P., Geisen, R., Holzapfel, W.H., 1997. Detection of aflatoxigenic fungi in figs by a PCR reaction. *Int. J. of Food Microbiol.* 36, 215-220.
- Fazekas, B., Tar, A.K., Zomborszky-Kovacs, M., 2002. Ochratoxin A contamination of cereal grains and coffee in Hungary in the year 2001. *Acta Veterinaria Hungarica.* 50 (2), 177-188.
- Hansen, B.M., Leser, T.D., Hendriksen, N. B., 2001. Polymerase chain reaction assay for the detection of *Bacillus cereus* group cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 202, 209-213.
- Jelinek, C.F., 1987. Joint FAO/WHO/UNEP Int. Conf. Mycotoxins, 2nd, Bangkok, Thailand.
- Kappe, R., Fauser, C., Okeke, C.N., Maiwald, M., 1996. Universal fungus-specific primer systems and group-specific hybridization oligonucleotides for 18 rDNA. *Mycoses*, 39, 25-30.

- Kroken, S., Glass N. L., Taylor J. W, Yoder O. C., Turgeon B. G.. 2003. Phylogenomic analysis of type I polyketide synthase genes in pathogenic and saprobic ascomycetes. PNAS. 100: 15670-15675.
- Kuiper-Goodmand, T., Scott, P.M., 1989. Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. Biomed. Environ. Sci. 2, 179-248.
- Krogh, P., 1987. Ochratoxin A in food. Mycotoxin in Food. Academic Press. San Diego, 97-121.
- Marek, P., Annamalai, T., Venkitanarayanan, K., 2003. Detection of *Penicillium expansum* by polymerase chain reaction. Int. J. Food Microbiol. 89, 139-144.
- O'Callaghan, J., Caddick, M.X., Dobson, A. D. W., 2003. A polyketide synthase required for ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus*. Microbiol. 149, 3485-3491.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D., 1997. Fungi and Food Spoilage, 2<sup>nd</sup> ed. Aspen Publishers, Gaithersburg, MD.
- Pohland, A. E., Nesheim, S., Friedman, L., 1992. Ochratoxin A: a review. Pure Appl. Chem. 64, 1029-1046.
- Pohland, A.E., 1993. Mycotoxins in review. Food Addit. Contam. 10, 17-28.
- Richard, J. L., Thurston, J. R, 1986. Diagnosis of mycotoxicoses. Martinus Nijhoff, Boston.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. Molecular cloning. Cold Spring Harbor laboratory press.
- Schmidt H., Bannier M., Vogel R.F., Niessen L. 2004. Detection and quantification of *Aspergillus ochraceus* in green coffee by PCR. Lett. In Apl. Microbio.38 (6): 464.
- Studer-Rohr, I., Dietrich, D.R., Schlatter, C., 1995. The occurrence of ochratoxin A in coffee. Food Chem. Toxicol. 5, 341-355.
- Sweeney, M.J., Pàmies, P., Dobson, A.D.W, 2000. The use of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for monitoring aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus* 439. Int. J. of Food Microbiol. 56, 97-103.
- Taniwaki, M.H., Pitt, J. I., Teixeira, A.A., Iamanaka, B.T., 2003. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. Int. J. of Food Microbiol. 82 (2), 173-179.

- Van der Merwe, K.J., Steyn, P. S., Fourie, L., de Scott, B., Theron, J.J., 1965. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* wilh. Nature 205, 1112-1113.
- Vanittanakom, N., Vanittanakom, P., Hay, R.J., 2002. Rapid Identification of *Penicillium marneffei* by PCR-Based Detection of Specific Sequences on the rRNA Gene. J. Clin. Microbiol. 40 (5), 1739-1742.
- Vrabcheva, T., Usleber, E., Dietrich, R., Martlbauer, E., 2000. Co-occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals from Bulgarian villages with a history of Balkan endemic nephropathy. J. of Agric. and Food Chem. 48(6), 2483-2488.
- Wolff, J., 2000. Ochratoxin A in cereals and cereal products. Arch. Lebensmittelhyg. 51, 85-88.
- Wolff, J., Bresch, H., Cholmakov-Bodechtel, C., Engel, G., Garais, M., Majerus, P., Rosner, H., Scheuer, R., 2000. Ochratoxin A: contamination of foods and consumer exposure. Arch. Lebensmittelhyg. 51, 81-128.
- Zhou, G., Whong, W.Z., Ong, T., Chen, B., 2000. Development of a fungus-specific PCR assay for detecting low-level fungi in an indoor environment. Mol. And Cell. Probes, 14, 339-348.



**Fig.1.** Cloning of AoLC35-12 sequence in *A. ochraceus* NRRL 3174 by “gene walking” strategy.

A: Cloning of KS domain sequence by PCR on genomic DNA using primers LC3/LC5c (Bingle et al., 1999)

B: Partial alignment of KS domain sequence with other PKSs found by Blast.

Chpks3 (accession number: AAR90258), chpks5 (accession n°: AAR90260), chpks6 (accession n°: AAR90261) in *Cochliobolus heterostrophus* (Kroken et al., 2003); m1B (diketide synthase of compactin, BAC20566, *P. citrinum*).

Sequence between KS and AT domains was amplified using a specific primer (KS-ATL) placed at the end of KS domain and a degenerated primer (ATR).

C: Overlaps of AoLC35-12 sequence with the ochratoxin A polyketide sequence otapks (O’Callaghan et al., 2004)



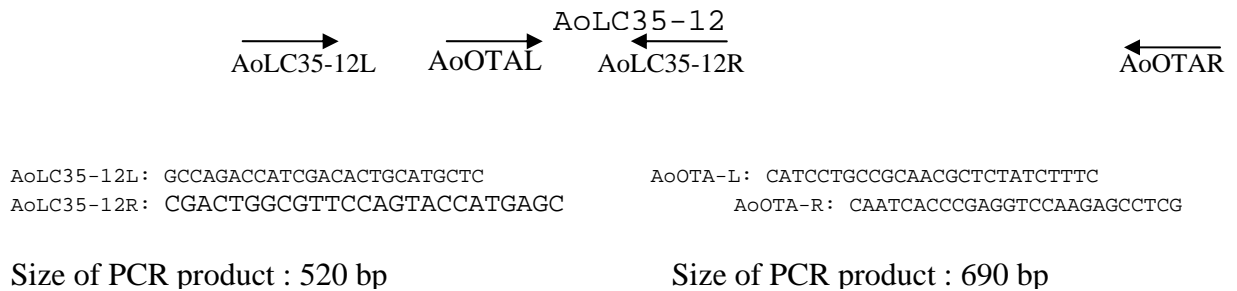
A

```

AoLC35-12      ...LRGTSQTIDTACSSS.....VNLI EHPAATLYL.....VEAHGTGTPVGDP.....RRASINSFGFGGTNAH.....SEALGPRVIGTLQL...
chpks5-AAR90260 ...LKGPSVTIDTACSSS.....VTILNYPGDVNGM.....VEAHGTGTKQGDA.....RRVSINSFGVGGTNAH.....SRAAEALIAPSEQM...
chpks6-AAR90261 ...LRGPSLTIDTACSSS.....ANLMFGPDMSILL.....VEAHGTGTMAGDP.....RRASINSFGFGGANAH.....ATAPHPCVTEIGGG...
mlB-BAC20566   ...LRGPSVTVDTACSTT.....ANLLLNPDPVFVTM.....VEAHGTGTPPTGDP.....RRASVNNFGFGGSNAH.....SY...
lovF-AAD34559  ...LRGPSVSIDTACSTT.....ANLLLNPDPVFTMS.....VEAHGTGTRAGDP.....RRASINNFGFGGANAH.....SY...
consensus      ...LrGpSvtiDTACSSs.....anl***p*****.....VEAHGTGT**GDP.....RRaSiNSFGfGG*NAH.....*****...

```

B



**Fig. 2.** A: Partial alignment of the KS domain of AoLC35-12 from *A. ochraceus* with several other KS domains: chpks5 (accession number: AAR90260), chpks6 (accession n° : AAR90261) (*Cochliobolus heterostrophus*); mlB (diketide synthase of compactin, BAC20566, *P. citrinum*); lovF (diketide synthase of lovastatin, AAD34559, *A. terreus*).

B: Schema of primer selection from AoLC35-12 sequence in *A. ochraceus* NRRL 3174

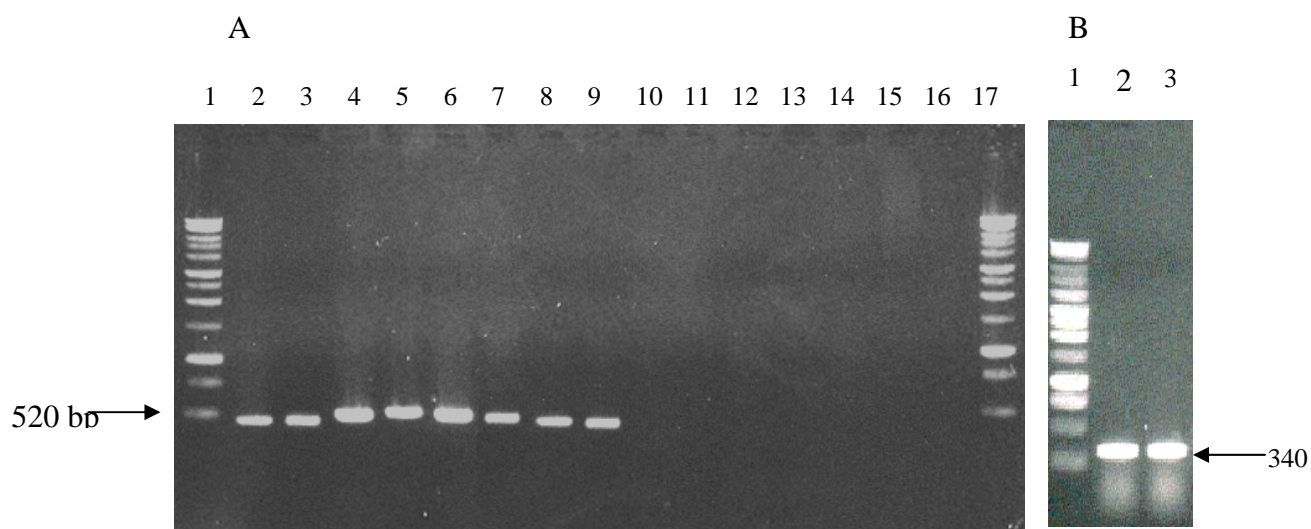


Fig. 3. A: 2 % of agarose gel electrophoresis of PCR products with AoLC35-12L/AoLC35-12R primers. Lane 1 and 17, 1 kb DNA ladder (Promega); Lane 2, *A. carbonarius* M333; Lane 3, *A. carbonarius* 2MU314; Lane 4, *A. melleus* NRRL 3519; Lane 5, *A. ochraceus* NRRL 3174; Lane 6, *A. sulfureus* NRRL 4077; Lane 7, *P. verrucosum* NRRL 3711; Lane 8, *P. citrinum* NRRL 1843; Lane 9, *M. ruber*; Lane 10, *A. flavus*; Lane 11, *A. fumigatus*; Lane 12, *F. culmorum* ITCF 11; Lane 13, *F. graminearum* NRRL 5883; Lane 14, *Byssosclamyces nivea* NRRL 2416; Lane 15, *F. verticillioides* NRRL 6442; Lane 16, negative control.

B: Positive control. Lane 1 and 17, 1 kb DNA ladder; Lane 2, *A. carbonarius* M333; Lane 3, *A. carbonarius* 2MU314.

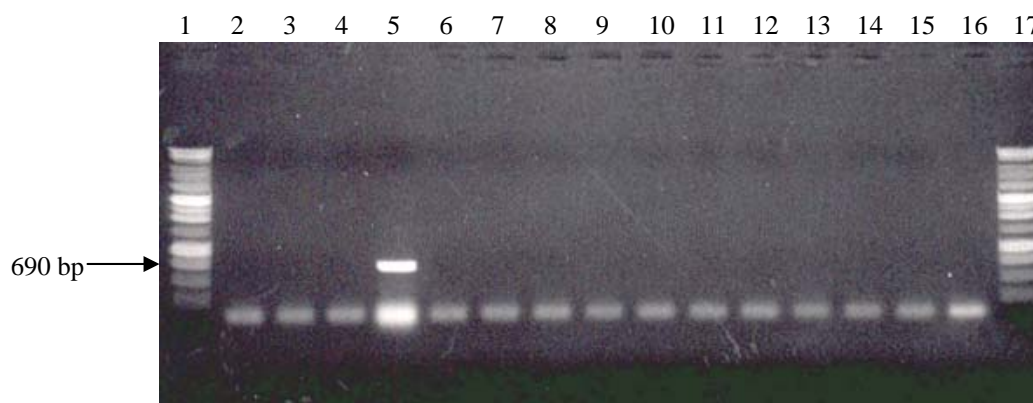


Fig. 4: 1 % of agarose gel electrophoresis of PCR products with AoOTAL/AoOTAR primers. Lane 1 and 17, 1 kb DNA ladder (Promega); Lane 2, *A. carbonarius* M333; Lane 3, *A. carbonarius* 2MU314; Lane 4, *A. melleus* NRRL 3519 ; Lane 5, *A. ochraceus* NRRL 3174; Lane 6, *A. sulfureus* NRRL 4077; Lane 7, *P. verrucosum* NRRL 3711; Lane 8, *P. citrinum* NRRL 1843 ; Lane 9, *M. ruber* ; Lane 10, *A. flavus*; Lane 11, *A. fumigatus*; Lane 12, *F. culmorum* ITCF 11; Lane 13, *F. graminearum* NRRL 5883; Lane 14, *Byssoschlamys nivea* NRRL 2416; Lane 15, *F. verticillioides* NRRL 6442; Lane 16, negative control.

B: Positive control. Lane 1 and 17, 1 kb DNA ladder; Lane 2, *A. carbonarius* M333; Lane 3, *A. carbonarius* 2MU314.

Table 1. Fungal strains used and results of PCR conducted with AoLC35-12L/AoLC35-12R and AoOTAL/AoOTAR primers.

Species	Produced mycotoxins	PCR <sup>1</sup>	PCR <sup>2</sup>
<i>Aspergillus carbonarius</i> M333 (isolated from coffee)	Ochratoxin A	+	-
<i>A. carbonarius</i> 2Mu134 (isolated from grape)	Ochratoxin A	+	-
<i>A. flavus</i> INRA Toulouse (*)	Aflatoxins B1, B2, G1, G2	-	-
<i>A. melleus</i> NRRL 3519 (**)	Ochratoxin A	+	-
<i>A. ochraceus</i> NRRL 3174	Ochratoxin A, Penicillic acid	+	+
<i>A. sulfureus</i> NRRL 4077	Ochratoxin A	+	-
<i>A. fumigatus</i> NCPT 13 (***)	Gliotoxin, Fumagillin	-	-
<i>Byssochlamys nivea</i> NRRL 2615	Patulin	-	-
<i>Fusarium culmorum</i> ITCF 11 (****)	Deoxinivalenol	-	-
<i>F. graminearum</i> NRRL 5883	Fumonisin, Zearalenone	-	-
<i>F. verticillioides</i> NRRL 6442	Fumonisin B1, B2, B3, B4	-	-
<i>Penicillium citrinum</i> NRRL 1843	Citrinin	+	-
<i>P. verrucosum</i> NRRL 3711	Ochratoxin A	+	-
<i>Monascus ruber</i> NCPT 5	Citrinin	+	-

<sup>1</sup>: PCR with primer pair AoLC35-12L/AoLC35-12R

<sup>2</sup>: PCR with primer pair AoOTAL/AoOTAR

+ : positive PCR response ; - : negative PCR response

\* : INRA : Institut National de Recherche Agronomique, France

\*\* : NRRL : Northern Regional Research Laboratory, Illinois, USA

\*\*\* : NCPT: Numéro de Collection du laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie, France

\*\*\*\* : ITCF : Institut [Technique des Céréales et des Fourrages , France](#)

## Discussion et Conclusion Générales

Ce travail a permis dans un premier temps de mettre en évidence une diversité des polycétones chez *A. ochraceus* NRRL 3174 aux niveaux du génome et des métabolites produits.

En utilisant les amorces dégénérées ciblant les deux domaines conservés des PKS, KS et AT, nous avons montré l'existence de 10 PKS différentes de type I dans le génome d'*A. ochraceus* NRRL 3174. En tenant compte des PKS identifiées chez cette espèce par d'autres équipes (Edwards *et al.*, 2002, Varga *et al.*, 2003), le nombre de PKS s'élève à 13. Il existe sans aucun doute d'autres PKS qui n'ont pas été identifiées chez *A. ochraceus*. Seul le séquençage de son génome entier permettra l'identification de toutes les PKS. Chez certains champignons, l'étude de leur génome a permis de connaître le nombre des PKS qu'ils possèdent, par exemple 14 chez *A. fumigatus*, 20 chez *A. nidulans* (Varga *et al.*, 2003), 25 PKS chez *C. heterostrophus*, 15 chez *G. moniliformis*, 16 chez *G. zae* et 20 chez *Botryotinia fuckeliana* (Kroken *et al.*, 2003).

La diversité des gènes de PKS semble être une propriété relativement générale chez les moisissures (Kroken *et al.*, 2003 ; Varga *et al.*, 2003 ). Les PKS identifiées chez *A. ochraceus* sont distribuées dans trois groupes principaux : les PKS réduites, les PKS partiellement réduites et les PKS non réduites. *A. ochraceus* NRRL 3174 est capable de produire plus de 20 polycétones (Bode *et al.*, 2002 ; Torres *et al.*, 1998 ; Richard *et al.*, 1999 ; Frisvad and Thrane, 2002 ; Van Der Merwe *et al.*, 1965 ; Taniwaki *et al.*, 2003). Parmi ceux-ci on rencontre l'OTA, la melleine, l'hydroxymelleine, l'acide orsellinique, l'acide pénicillique, l'acide dihydropénicillique, la patuline, la viomelleine, la xanthomegnine, l'asperlactone et l'isoasperlactone.

Par rapport à la capacité à produire de la patuline, *A. ochraceus* n'a été rapportée que par Varma *et al.* en 1991. La souche *A. ochraceus* isolée par ces auteurs à partir de la feuille de tabac peut produire à la fois la patuline et l'OTA. La patuline pose généralement des problèmes dans les fruits et les légumes chez lesquels les espèces *B. nivea*, *P. expansum* et *P. granulatum* dominent. C'est probablement la raison pour laquelle *A. ochraceus* ainsi que sa production de patuline n'ont pas été mises en cause.

Dans notre étude, l'identification de la patuline s'est faite sur la comparaison au niveau du spectre de maximum d'absorption et du temps de rétention de ce métabolite chez *A. ochraceus* avec le standard. Il est nécessaire de confirmer cela par la détermination de la structure de ce métabolite en faisant d'autres études.

Parmi les 13 PKS identifiées chez *A. ochraceus*, nous connaissons seulement le rôle de AoLC35-12 et Aomsas. AoLC35-12 intervient dans la biosynthèse de l'OTA. Aomsas intervient dans la biosynthèse des tétracétones lactones : acide pénicillique, patuline et asperlactone mais également dans la biosynthèse du pentacétone comme l'OTA. C'est la première fois qu'un gène intervenant dans la biosynthèse de l'acide orsellinique, précurseur de l'acide pénicillique a été caractérisé chez les champignons. C'est la raison pour la quelle nous n'avons aucun élément de comparaison. Chez *S. viridochromogenes* ainsi que chez *Micromonospora pura*, les gènes de polycétones synthèses responsables de la biosynthèse de l'acide orsellinique ne contiennent pas de domaine KR (Gaisser *et al.*, 1997), et sont donc plus courts que le gène *aomsas*. C'est aussi la première fois qu'un gène PKS intervenant dans la formation de plusieurs polycétones a été caractérisé chez les champignons. Cela suggère l'existence de voies de biosynthèses croisées chez *A. ochraceus* dans lesquelles Aomsas joue un rôle clé. L'implication de ce gène dans la biosynthèse de l'OTA suggère un rôle de contrôle ou de production des inducteurs pour ce métabolite. Cependant des études supplémentaires sont nécessaires afin de pouvoir lui attribuer un rôle précis.

D'autres études menées au laboratoire par Awad *et al.* (2005) ont permis l'obtention des mutants d'*A. ochraceus*. Parmi ceux-ci, un a perdu la capacité de pigmentation. Par RT-PCR, nous avons trouvé que la PKS AoLC12-14 qui a environ 60% d'identité avec les PKS de la mélanine chez *Nodulisporium* sp (Fulton *et al.*, 1999) et *Colletotrichum lagenarium* (Takano *et al.*, 1995) ne s'exprime pas. Il y a de fortes chances que cette PKS intervienne dans la biosynthèse de la mélanine chez *A. ochraceus* NRRL 3174.

La stratégie 'gene walking', en combinant une amorce spécifique à partir de la séquence connue et une amorce dégénérée déduite d'une région conservée de la PKS a été utilisée avec succès. Cette approche est plus simple et plus rapide que l'obtention des gènes en construisant une banque d'ADN génomique ou d'ADNc, notamment quand le nombre de gènes ciblés est limité. Cependant, il nécessite d'autres amorces

plus spécifiques que ATR et AT1 pour amplifier et séquencer les domaines AT d'autres PKS (AoKS9, AoKS11...).

La mise au point du protocole de l'obtention des mutants par interruption du gène a été faite pour *A. ochraceus* NRRL 3174. Le rendement de transformation dépend de la qualité des protoplastes. Ceux-ci doivent être très délicatement préparés. Ce protocole permettra de déterminer le rôle d'autres PKS identifiées dans la biosynthèse des polycétones chez *A. ochraceus*.

Le développement des amorces spécifiques à partir de la séquence AoLC35-12, responsable de la formation de l'OTA, a permis de détecter par méthode PCR des producteurs de l'OTA et de la citrine. Le couple d'amorces spécifiques AoLC35-12L/AoLC35-12R nous a permis de détecter par la méthode de PCR des producteurs importants de l'OTA : *A. ochraceus*, *A. carbonarius* et *P. verrucosum*, ainsi que les producteurs de la citrine *P. citrinum* et *M. ruber*. Ces résultats sont intéressants car l'OTA et la citrinine sont souvent détectées en même temps dans les céréales (Vrabcheva *et al.*, 2000). Le couple d'amorces AoOTAL/AoOTAR ne permet de détecter que *A. ochraceus*. Certaines PKS ont été identifiées chez *A. carbonarius*, *P. verrucosum* et *P. citrinum*, ce qui nous a permis de développer les couples d'amorces ciblant spécifiquement l'un ou l'autre de ces champignons. En effet, d'après certains auteurs, les gènes PKS ne sont pas utilisables dans la détection moléculaire des champignons en raison de leur conservation (Mayorga et Timberlake, 1992). Notre travail a montré qu'il s'agit du choix judicieux des amorces spécifiques pour chaque espèce ciblée.

L'ensemble de ces résultats de cette dernière partie a été transféré aux industriels pour développer des systèmes de détection/quantification des producteurs de mycotoxines et par la suite quantifier les mycotoxines dans les matières alimentaires par Q-PCR. Les tests ont montré une étroite corrélation entre la quantité d'ADN du champignon producteur et la quantité de mycotoxine présente dans la denrée alimentaire (Lebrihi, communication orale).

## Perspectives

Les résultats obtenus ont permis de comprendre un certain nombre de choses concernant le métabolisme secondaire chez *A. ochraceus*. Ils ont également permis d'ouvrir de nouvelles pistes d'exploration qui sont résumées comme suite :

### **1. Comprendre le rôle précis du gène *aomsas* chez *A. ochraceus* NRRL 3174**

Le rôle du gène *aomsas* devra être précisé davantage. En effet quelle est la nature de son intervention à la fois dans la biosynthèse d'AP et d'OTA. S'agit-il d'un gène de structure dans le cas des deux voies de biosynthèse ou produit-il une molécule régulatrice ? Les voies de biosynthèse d'OTA et d'AP sont-elles partiellement associées ou totalement séparées ? Ce sont des questions importantes sur les quelles il faut essayer de répondre dans les prochains travaux.

### **2. Etudier la voie de biosynthèse d'AP et d'OTA**

Les gènes PKS, responsables de la production de ces mycotoxines ont été identifiés. Il serait intéressant de caractériser d'autres gènes de la voie de biosynthèse d'OTA et d'acide pénicillique. Deux démarches peuvent être envisagées. La construction d'une banque de ADNc ou la construction d'une banque d'ADN génomique. Au cours de mon travail j'ai construit une banque de ADNc d'*A. ochraceus* NRRL 3174. La qualité de cette banque a été vérifiée par séquençage des fragments insérés de certains clones. Le criblage de cette banque en utilisant les sondes fabriquées à partir des PKS connues permettra de séquencer totalement les gènes ciblés et d'en rechercher de nouveaux.



### **3. Déterminer le rôle d'autres PKS identifiées chez *A. ochraceus* NRRL 3174**

La technique d'interruption de gène est bien maîtrisée au sein du laboratoire, il sera relativement facile d'enchaîner avec cette technique pour interrompre les autres PKS caractérisées, afin de vérifier leur rôle dans la biosynthèse de différents polycétones chez *A. ochraceus*.

### **4. Optimisation des systèmes de détection rapide des champignons toxigènes**

Les séquences caractérisées peuvent servir comme marqueurs génétiques du potentiel de production d'OTA, d'acide pénicillique ou d'autres mycotoxines chez *A. ochraceus* et les espèces les plus proches. Ainsi un choix judicieux d'amorces permettra de développer la Q-PCR pour la quantification des champignons ochratoxinogènes dans les matrices alimentaires. Ce travail est d'ailleurs en cours dans le cadre d'une collaboration avec des industriels en vue de commercialiser un kit permettant cette quantification.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## Références

1. **Abe, Y., T. Suzuki, C. Ono, K. Iwamoto, M. Hosobuchi, and H. Yoshikawa.** 2002. Molecular cloning and characterization of an ML-236B (compactin) biosynthetic gene cluster in *Penicillium citrinum*. *Mol. Genet. Genomics*, 267: 636-646.
2. **Abrell, B., P. Borgeson, and P. Crews.** 1996. Chloro polyketides from the cultured fungus (*Aspergillus*) separated from a marine sponge. *Tetrahedron Lett.* 37: 2331-2334.
3. **Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman.** 1997. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
4. **Assante, G., R. Locci, L. Camarda, L. Merlini, and G. Nasini.** 1977. Screening of the genus *Cercospora* for secondary metabolites. *Phytochemistry*. 16 : 243-247.
5. **Awad, G., F. Mathieu, Y. Copprl, and A. Lebrihi.** Characterization and regulation of new secondary metabolites from *Aspergillus ochraceus* M18 obtained by UV mutagenesis. *Can. J. of Microbiol.* 51(1): 59-67.
6. **Axberg, K., and S. Gatenbeck.** 1975. Intermediates in the penicillic acid biosynthesis in *Penicillium cyclopium*. *Acta Chem. Scand. Ser. B* 29: 749-751.
7. **Axberg, K., and S. Gatenbeck.** 1975. The enzyme formation of penicillic acid. *FEBS letters.* 54(1): 18-20.
8. **Bacon, C. W., J. G. Sweeney, J. D. Robbins, and D. Burdick.** 1973. Production of penicillic acid and ochratoxin A on poultry feed by *Aspergillus ochraceus*: temperature and moisture requirements. *Appl. Microbiol.* 26(2):155-60.
9. **Bando, M., M. Hasegawa, T. Tsuboi, Y. Miyake, M. Shiina, M. Ito, H. Handa, K. Nagai, and T. Kataoka.** 2003. The mycotoxin penicillic acid inhibits

fas ligand –induced apoptosis by blocking self-processing of caspase-8 in death – inducing signalling complex. J. Biol. Chem. 278: 5786-5793.

- 10. Barger, G.** 1931. Ergot and ergotism. Gurney and Jackson, London. UK.
- 11. Basak, K., and S. K. Majumdar.** 1973. Utilization of carbon and nitrogen sources by *Streptomyces kanamyceticus* for kanamycin production. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 6-10.
- 12. Beck, J., S. Ripka, A. Siegner, E. Schiltz, and E. Schweizer.** (1990). The multifunctional 6-methylsalicylic acid synthase gene of *Penicillium patulum*: Its gene structure relative to that of other polyketide synthases. Eur. J. Biochem. **192**, 487–498.
- 13. Behal, V.; Hostalek, Z. and Vanek, Z. (1979).** A hydrotetracycline oxygenase activity and biosynthesis of tetracycline in *streptomyces aureofaciens*. *Biotechnol Lett* **1**, 177-182.
- 14. Berdy J.** 1974. Are actinomycetes exhausted as a source of secondary metabolites? Proceedings of the 9<sup>th</sup> International Symposium on the biology of actinomycetes Part 1. Allerton Press. NewYork. 3-23.
- 15. Bhatnagar, D., K. C. Ehrlich, and T. E. Cleveland.** 2003. Molecular genetic analysis and regulation of aflatoxin biosynthesis. Appl. Microbiol. Biotechnol. 61 : 83-93.
- 16. Bihel, F., G. Quéléver, H. Lelouard, A. Petit, C. Alvès da Costa, O. Pourquié, F. Checler, P. Thellend, P. Pierre, and J. L. Kraus.** 2003. Synthesis of new 3-Alkoxy-7-amino-4-chloro-isocoumarin derivatives as new  $\beta$ -Amyloid peptide production inhibitors and their activities on various classes of protease. Bioorganic and Medicinal Chemistry. 11: 3141-3152.

- 17. Bill, G., A. Dombrowski, F. Pezael, J. Polishook, and A. Zhiqiang.** 2002. Recent and future discoveries of pharmacologically active metabolites from tropical fungi. *Tropical mycology*. Vol. 2. Micromycetes.
- 18. Bingle, L. E., T. J. Simpson, and C. M. Lazarus.** 1999. Ketosynthase domain probes identify two subclasses of fungal polyketide synthase genes. *Fungal Genet. Biol.* 26: 209-223.
- 19. Bluhm, B. H., M. A. Cousin, and C. P. Woloshuk.** 2004. Multiplex real-time PCR detection of fumonisin-producing and tricothecene-producing groups of *Fusarium* species. *J. of Food Protect.* 67(3): 536-543.
- 20. Bode, H. B., B. Bethe, R. Hofs, and A. Zeeck.** 2002. Big effects from small changes: possible ways to explore Nature's chemical diversity. *Chem. Biochem.* 3: 619-627.
- 21. Bourgeois, C. M., J. F. Mescle, et J. Jucca.** 1996. *Microbiologie alimentaire*. Tome 1 : Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Lavoisier TEC&DOC. France.
- 22. Brereton, R. G., M. J. Garson, and J. Staunton.** 1984. Biosynthesis of fungal metabolites: asperlactone and its relationship to other metabolites of *Aspergillus melleus*. *J. of the Chem. Soc., Perkin Transactions 1: Organic and Bio-organic Chem.* 5: 1027-1033.
- 23. Bridge, P. D., D. K. Arora, C. A. Reddy, and R. P. Elander.** 1998. Applications of PCR in mycology. CAB International. UK.
- 24. Butler, M. J., and A. W. Day.** 1998. Fungal melanins: a review. *Can. J. Microbiol.* 44: 1115-1136.

25. **Cahagnier, B., S. Dragacc, C. Frayssinet, J. M. Frémy, G. L. Hennebert, L. Lesage-meessen, J. L. Multon, D. Richard-Molard, and M. F. Roquebert.** 1998. Moisissuers des aliments peu hydrates. Lavoisier Tec&Doc. France.
26. **Camarda, L., L. Merlini, and G. Nasini.** 1976. Metabolites of *Cercospora*. Taiwapyrone, an  $\alpha$ -pyrone of unusual structure from *Cercospora Taiwanensis*. *Phytochemistry*. 15: 537-539.
27. **Canabes, F. J., F. Accensi, M. R. Bragulat, M. L. Abarca, G. Castella, S. Minguez, and A. Pons.** 2002. What is the source of ochratoxin A in wine ? *Inter. J. of Food Microbiol.* 79: 213-215.
28. **Cardova, E.; Kremen, A.; Vanek, Z. and Hostalek, Z. (1976).** Regulation and biosynthesis of secondary metabolites, XVII: adenylate level and chlorotetracycline production in *Streptomyces aureofaceins*. *Folia Microbiol* **21**, 481-487.
29. **Carlile, M. J., and S. C. Watkinson.**1997. The fungi. Academic Press. San diego. CA.
30. **Chang, P.K.; Ehrlich, K.C.; Yu, J.; Bhatnagar, D. and Cleveland, T.E. (1995).** Increased expression of *Aspergillus parasiticus aflR*, encoding a sequence specific DNA-binding protein, relieves nitrate inhibition of aflatoxin biosynthesis. *Appl Environ Microbiol* **61**, 2372-2377.
31. **Charda, B. S., and H. S. Garcha.** 1992. Mixed cultivation of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus ochraceus* for improved cellulose production. *Acta Microbiol. Hung.* 39: 61-67.
32. **Chen, K. C., W. S. Yin, C. Tiu, and J. Y. Houng.** 1994. 11  $\alpha$ -hydroxylation of progesterone using modified alginate-immobilized cells. *Enzyme Micro. Technol.* 16: 551-555.

- 33. Christensen, M., and D. E. Tuthill.** 1985. *Aspergillus*: an overview. Advances in *Aspergillus* and *Penicillium* systematic. Edited by RA. New York.
- 34. Ciegler, A., and C. P. Kurtzman.** 1970. Penicillic acid production by blue-eye fungi on various agriculture commodities. Appl. Microbiol. 20 (5): 761-764.
- 35. Coker, R. D.** 1997. Mycotoxins and their control: constraints and opportunities. NRI Bulletin 73. Chatham, Reino Unido: Natural Resources Institute.
- 36. Cole, J., and R. H. Cox.** 1981. Handbook of toxic fungal metabolites. New York: Academic press.
- 37. Cole, R. J., J. H. Moore, N. D. Davis, J. W. Kirksey, and U. L. Diener.** 1971. 4-Hydroxymellein: a new metabolite of *Aspergillus ochraceus*. J. Agri. Food Chem. 19: 909-911.
- 38. Comerio, R., V. E. F. Pinto, and G. Vaamonde.** 1998. Influence of water activity on *Penicillium citrinum* growth and kinetics of citrinin accumulation in wheat. Inter. J. of Food Microbiol. 42:219-223.
- 39. Cox, R. J.** 2002. Biosynthesis. Annu. Rep. Prog. Chem., Sect. B, 98: 223-251.
- 40. Curtin, T. M, and J. Tuite.** 1996. Emesis and refusal of feed in swin associed with *Gibberella zeae* infected corn. Life Sci. 5: 1937-1944.
- 41. Dai, J. R., B. K. Carté, P. J. Sidebottom, and M. S. Butler.** 2001. Circumdatin G, a new alkaloid from the fungus *Aspergillus ochraceus*. J. Nat. Prod. 64: 125-126.
- 42. Demain, A. L.** 1999. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. Appl. Microbiol. Biotechnol. 52(4): 455-463.

- 43. Doull, J.C. and Vining, L.C. (1990).** Physiology of antibiotic production in actinomyces and some control mechanisms. *Biotech Adv* **8**, 141-158.
- 44. Donnelley, R. R.** 2002. Overview of polyketides. 29-March Report Kosan Biosciences. Kosan Company.
- 45. Durley, R. C., J. Macmillan, T. J. Simpson, A. T. Glen, and W. B. Turner.** 1975. Fungal products. Part XIII. Xanthomegnin, viomellein, rubrosulphin, and viopurpurin, pigments from *Aspergillus sulphureus* and *Aspergillus melleus*. *J. Chem. Soc. Perkin*. 163-169.
- 46. Edwards, S. G., J. O'Callaghan, and A. D. W. Dobson.** 2002. PCR-based detection and quantification of mycotoxigenic fungi. *Mycol. Res.* 106: 1005-1025.
- 47. Endo, A., M. Kuroda, and M. Tsujita.** 1976. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinum*. *J. Antibiot.* 29: 1346-1348.
- 48. Färber, P., R. Geisen, R., W. H. Holzapfel.** 1997. Detection of aflatoxigenic fungi in figs by a PCR reaction. *Int. J. of Food Microbiol.* 36, 215-220.
- 49. Fazekas, B., A. K. Tar, and M. Zomborszky-Kovacs.** 2002. Ochratoxin A contamination of cereal grains and coffee in Hungary in the year 2001. *Acta Veterinaria Hungarica.* 50 (2), 177-188.
- 50. Feng, G. H, and T. J. Leonard.** 1998. Culture conditions control expression of the Genes for aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus* and *A. nidulans*. *Appl. and Environ. Microbiol.* 64: 2275-2277.
- 51. Ferreira, N.P. (1968).** The effect of amino acids on the production of ochratoxin A in chemically defined media. *Antonie van Leeuwenhoek J Microbiol Serol* **34**, 433-440.



- 52. Fitzgerald, J. M., R. G. Collin, N. R. Towers.** 1998. Biological control of sporidesmin-producing strains of *Pithomyces chartarum* by biocompetitive exclusion. Lett. Appl. Microbiol. 26(1): 17-21.
- 53. Frisvad, J. C., and T. B. Viuf.** 1986. Comparison of direct and dilution plating for detecting *Penicillium viridicatum* in barley containing ochratoxin. I: King, A. D., J. I. Pitt, L. R. Beuchat, and J. E. L. Corry (eds). Methods for the mycological examination of food. Plenum Press. New York.
- 54. Frisvad, J. C., and U. Thrane.** 1987. Standardized high-performance liquid chromatography of 182 mycotoxins and other fungal metabolites based on alkylphenone retention indices and UV-VIS spectra (diodearray detection). J. Chromatogr. A. 404: 195-214.
- 55. Fuchser, J., and A. Zeeck.** 1997. Secondary metabolites by chemical screening. 34. – Aspinolides and aspinonene/aspyrone co-metabolites, new pentaketides produced by *Aspergillus ochraceus*. Liebigs Ann./Recueil. 1: 87-95.
- 56. Fulton, T. R, N. Ibrahim, M. C. Losada, D. Grzegorski and J. S. Tkacz.** 1999. A melanin polyketide synthase (PKS) gene from *Nodulisporium* sp. that shows homology to the *pksl* gene of *Colletotrichum lagenarium*. Mol. Gen. Genet. 262(4-5):714-20.
- 57. Gaisser, S., A. Trefzer, S. Stockert, A. Kirschning, and A. Bechthold.** 1997. Cloning of an avilamycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces viridochromogenes* Tü57. J. of Bacteriol. 179 (20):6271-6278.
- 58. Gams, W., and H. I. Nirenberg.** 1998. A contribution to the generic definition of *Fusarium*. Mycotaxon. 35: 407-416.
- 59. Garson, M. J., J. Staunton, and P. G. Jones.** 1984. New polyketide metabolites from *Aspergillus melleus*: structural and stereochemical studies. Journal of the

Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-organic Chemistry (1972-1999). 5: 1021-1026.

- 60. Gaucher, G. M., and M. G. Shepherd.** 1968. Isolation of orsellinic acid synthase. *Biochem. And Biophys. Res. Com.* 32(4): 664-671.
- 61. Geisen, D. M., J. I. Pitt, J. W. Taylor.** 1998. Cryptic speciation and recombination in the aflatoxin-producing fungus, *Aspergillus flavus*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USAS.* 95: 388-393.
- 62. Geisen, D. M., J. W. Dorner, B. W. Horn, and J. W. Taylor.** 2000. The phylogenetics of mycotoxin and sclerotium production in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet. Biol.* 31: 169-179.
- 63. Geisen, R.** 2004. Molecular monitoring of environmental conditions influencing the induction of ochratoxin A biosynthesis genes in *Penicillium nordicum*. *Mol. Nutrition Food Res.* 48.
- 64. Gokhale, R. S., and D. Tuteja.** 2001. Biochemistry of polyketide synthases. In: *Biotechnology*. Eds. Reid and Rehm. Wiley-Vch Verlag GmbH. 10: 341-371.
- 65. Guzman-de-Pena, D., and J. Ruiz-Herrera.** 1997. Relationship between aflatoxin biosynthesis and sporulation in *Aspergillus parasiticus*. *Fungal Genet. and Biol.* 21: 198-205.
- 66. Hajjaj, H., A. Klaébé, M. O. Loret, G. Goma, P. J. Blanc, and J. François.** 1999. Biosynthetic pathway of citrinin in the filamentous fungus *Monascus ruber* as revealed by C<sup>13</sup> nuclear magnetic resonance. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(1): 311-314.
- 67. Hajjaj, H., P. Niederberger, and P. Duboc.** 2001. Lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus* in a chemically defined medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(6): 2596-2602.

- 68. Hald, B., D. H. Christensen, and P. Krogh.** 1983. Natural occurrence of the mycotoxin viomellein in barley and the associated quinine-producing penicillia. *Appl. Environ. Microbiol.* 46(6): 1311-1317.
- 69. Hansen, B. M., Leser, T. D., and N. B. Hendriksen.** 2001. Polymerase chain reaction assay for the detection of *Bacillus cereus* group cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 202: 209-213.
- 70. Harris, J. P., and P. G. Mantle.** 2001. Biosynthesis of diaporthin and orthosporin by *Aspergillus ochraceus*. *Phytochemistry.* 57: 165-169.
- 71. Hendrickson, L., C. R. Davis, C. Roach, D. K. Nguyen, T. Aldrich, P. C. Mcada, and C. D. Reeves.** 1999. Lovastatin biosynthesis in *Aspergillus terreus*: characterization of blocked mutants, enzyme activities and a multifunctional polyketide synthase gene. *J. Chem. Biol.* 6: 429-439.
- 72. Hoult, J. R. S., and M. Paya.** 1996. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: Natural products with therapeutic potential. *Gen. Pharma.* 27: 713-722.
- 73. Huff, W. E., and P. B. Hamilton.** 1979. Mycotoxins-their biosynthesis in fungi: ochratoxins-metabolites of combined pathways. *J. Food Prot.* 42: 815-820.
- 74. Johanning, E., M. Gareis, K. Nielsen, R. Dietrich, and E. Martlbauer.** 2002. Airborne Mycotoxin Sampling and Screening Analysis.
- 75. Jordan, P. M., and J. B. Spencer.** 1993. The biosynthesis of tetraketides: enzymology, mechanism and molecular programming. *Biochem. Soc. Transactions.* 21: 222-228.
- 76. Kacholz, T., and A. L. Demain.** 1983. Nitrate repression of averufin and aflatoxin biosynthesis. *J. Nat. Prod.* 46: 499-506.

- 77. Karolewicz, A., and R. Geisen.** 2004. Cloning a part of the ochratoxin A biosynthetic gene cluster of *Penicillium nordicum* and characterization of the ochratoxin polyketide synthase gene. System. And Appl. Microbiol. *In press*.
- 78. Keller, N. P., and T. M. Hohn.** 1997. Metabolic pathway gene clusters in filamentous fungi. Fungal Genet. Biol. 21: 17-29.
- 79. Keller, N. P., R. A. Wilson, J. W. Bok, and A. M. Calvo.** 2002. Relationship between secondary metabolism and fungal development. Microbiol. And Mol. Biol. Reviews. 66(3): 447-459.
- 80. Khosla, C., R. S. Gokhale, J. R. Jacobsen, and D. E. Cane.** 1999. Tolerance and specificity of polyketide synthases. Annu. Rev. Biochem. 68: 219-253.
- 81. Kiffer, E., et M. Morelet.** 1997. Les deutéromycètes. Institut National de la Recherche Agronomique.
- 82. Kozakiewicz, Z.** 1989. *Aspergillus* species on stored products. Mycological papers. 161:1-188.
- 83. Krogh, P.** 1987. Ochratoxin A in food. Mycotoxin in Food. Academic Press. San Diego. 97-121.
- 84. Krohn, K., R. Bahramsari, U. Florke, K. Ludewig, C. Kliche-Spory, A. Michel, H. J. Aust, S. Draeger, B. Schulz, and S. Antus.** 1997. Dihydroisocoumarins from fungi: Isolation, structure elucidation, circular dichroism and biological activity. Phytochemistry. 45: 313-320.
- 85. Kroken, S., N. L. Glass, J. W Taylor, O. C. Yoder, and B. G. Turgeon.** 2003. Phylogenomic analysis of type I polyketide synthase genes in pathogenic and saprobic ascomycetes. PNAS. 100: 15670-15675.

86. **Kuiper-Goodmand T., and P. M. Scott.** 1989. Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomed. Environ. Sci.* 2: 179-248.
  
87. **Lal, R., R. Kumari, H. Kaur, R. khanna, N. Dhingra, and D. Tuteja.** 2000. Regulation and manipulation of the gene cluster encoding type-I PKSs. *Trends Biotechnol.* 18(6): 264-274.
  
88. **Langfelder, K., B. Jahn, K. Ghringer, A. Schmidt, G. Wanner, and A. A. Brakhage.** 1998. Identification of a polyketide synthase gene (*pksP*) of *Aspergillus fumigatus* involved in conidial pigment biosynthesis and virulence. *Med. Microbiol. Immunol.* 187: 79-89.
  
89. **Langseth, W., H. Stenwing, L. Sogn, and E. Mo.** 1993. Growth of moulds and production of mycotoxins in wheat during drying and storage. *Acta Agric. Scand. [B] Soil Plant Sci.* 43: 32-37.
  
90. **Larpent-Gourgau, M., et J. J. Sanglier.** 1992. *Biotechnologies : principes et méthodes.* Doin. Paris.
  
91. **Lea, T., K. Steien, and F. C. Stormer.** 1989. Mechanism of ochratoxin A-induced immunosuppression. *Mycopathologia.* 107 : 153-159.
  
92. **Le Bars, J., et P. Le Bars.** 1987. Les moisissures des denrées alimentaires et leurs séquences. Conférence de la « Section Midi-Pyrénées ». Toulouse.
  
93. **Lee, T., S. H. Yun, K. T. Hodge, R. A. Humber, S. B. Krasnoff, G. B. Turgeon, O. C. Yoder, and D. M. Gibson.** 2001. Polyketide synthase genes in insect-and nematode-associated fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56:181-187.
  
94. **Linnemannstons, P., J. Schulte, M. del Mar Prado, R. H. Protor, J. Avalos, and B. Tudzynski.** 2002. The polyketide synthase gene *pks4* from *Gibberella fujikuroi* encodes a key enzyme in the biosynthesis of the red pigment bikaverin. *Fungal Genet. Biol.* 37(2): 134-148.

95. **Liou, G. F., and C. Khosla.** 2003. Building-block selectivity of polyketide synthases. *Current Opinion in Chemical Biology*, 7: 1-6.
96. **Luchese, R.H. and Harrigan, W.F. (1993).** Biosynthesis of aflatoxin-the role of nutritional factors. *J Appl Bacteriol* **74**, 5-14.
97. **Lund, F., and J. C. Frisvard.** 2003. *Penicillium verrucosum* in wheat and barley indicates presence of ochratoxin A. *J. Appl. Microbiol.* 95: 1117-1123.
98. **Luster, M. I., D. R. Germolec, G. R. Burleson, C. W. Jameson, M. F. Ackermann, K. R. Lamm, and H. T. Hayes.** 1987. Selective immunosuppression in mice of natural killer cell activity by ochratoxin A. *Cancer Res.* 47: 2259-2263.
99. **Mannon, J., and E. Johnson.** 1985. Fungi down on the farm. *New Scientist*. 105: 12-16.
100. **Manzoni, M.; Bergomi, S.; Rollini, M. and Cavazzoni, V. (1999).** Production of lovastatins by filamentous fungi. *Biotechnol Lett* **21**, 253-7.
100. **Marek, P., T. Annamalai, and K. Venkitanarayanan.** 2003. Detection of *Penicillium expansum* by polymerase chain reaction. *Inter. J. Food Microbiol.* 89: 139-144.
101. **Martain, J.F. and Demain, A. L. (1980).** Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiol. Rev.* **44**, 230-251. **Mayer, C. F.** 1953. Endemic panmyelotoxicoses in the Russian gain belt. Part I. The clinical aspects of alimentary toxic aleukia (ATA), a comprehensive review. *Mil. Serg.* 113: 173-189.
102. **Mayorga, M. E., and W. E. Timberlake.** 1992. The developmentally regulated *Aspergillus nidulans* *wA* gene encodes a polypeptide homologous to polyketide and fatty acid synthases. *Molecular and General Genetics.* 235:205-212.

- 103. Messenger, A. J. and Turner, J. M. (1983).** Effect of growth conditions on phenazine production by *Pseudomonas phenazinium*. *J Gen Microbiol* **129**, 1013-1018.
- 104. Miller, V. R.** 2001. Evolving PCR-Based Technologies for Bioaerosol Detection and Quantification. Aetotech Laboratories, Inc. Phoenix Arizona. Miller, R. Mycotoxins in Mold-Colonized Drywall Obtained from a Field Investigation. Aetotech Laboratories, Inc. Phoenix Arizona.
- 105. Moore, J. H., N. D. Davis, and U. L. Diener.** 1972. Mellein and 4-Hydroxymellein production by *Aspergillus ochraceus* Wilhelm. *Appl. Microbiol.* 23: 1067-1072.
- 106. Mori, H., K. Kawai, F. Ohbayashi, T. Kuniyasu, M. Yamazaki, T. Hamasaki, and G. M. Williams.** 1984. Genotoxicity of a variety of mycotoxins in the hepatocyte primary culture/DNA repair test using rat and mouse hepatocytes. *Cancer Res.* 44: 2918-2923.
- 107. Morrice, J.; Mackenzie, D.A.; Parr, A.J. and Archer, D.B. (1998).** Isolation and characterization of the acetyl-CoA carboxylase gene from *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* **34**, 379-385.
- 108. Nicholson, T. P., B. A. M. Rudd, M. Dawson, C. M. Lazarus, T. J. Simpson, and R. J. Cox.** 2001. Design and utility of oligonucleotide gene probes for fungal polyketide synthases. *Chem. and Biol.* 8: 157-178.
- 109. Niehaus, W. G. J., and W. Jiang.** 1989. Nitrate induces enzymes of the mannitol cycle and suppresses versicolorin synthesis in *Aspergillus parasiticus*. *Mycopathologia.* 107: 131-139.
- 110. Nielsen, K, F., and J. Smedsgaard.** 2003. Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid

chromatography-UV- mass spectrometry methodology. J. Chromatogr. A. 1002: 111-136.

- 111. Nishikawa H.** 1933. Bull Agric Chem Soc Jpn. 9: 148-151.
- 112. Novey, H. S., and I. D. Wells.** 1978. Allergic bronchopulmonary aspergillosis caused by *Aspergillus ochraceus*. Am. J. Clin. Pathol. 70: 840-843.
- 113. O'Callaghan, J., M. X. Caddick, and A. D. W. Dobson.** 2003. A polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus*. Microbiology. 149: 3485-3491.
- 114. O'Hagan, D.** 1991. The polyketide metabolites. Ellis Horwood Limited. Grande Angletère.
- 115. Obana, H., Y. Kumeda, and T. Nishimune.** 1995. *Aspergillus ochraceus* production of 5,6-dihydropenicillic acid in culture and foods. J. of Food Protection. 58: 519-523.
- 116. Olsen, J. E., S. Aabo, W. Hill, S. Notermans, K. Wernars, P. E. Granum. T. Popovic, H. N Rasmussen, and O. Olsvik.** 1995. Probes and polymerase chain reaction for detection of food-borne bacterial pathogens. Inter. J. of Food. Microbiol. 28: 1-78.
- 117. Olsen, M., N. Jonsson, N. Magan, J. Banks, C. Fanelli, A. Rizzo, A. Haikar, A. Dobson, J. Frisvad, S. Holmes, J. Olkku, S. J. Persson, and T. Börjesson.** 2003. Prevention of Ochratoxin A in Cereals. OTA PREV. Final Report. Quality of Life and Management of Living Resources. Project No. QLK1-CT-1999-00433.
- 118. Pardo, E., S. Marin, V. Sanchis, A. J. Ramos.** 2004. Prediction of fungal growth and ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* on irradiated



barley grain as influenced by temperature and water activity. *Inter. J. Food Microbiol.* 95(1):79-88.

- 119. Parisi, A., M. Piattelli, C. Tringali, G. San Lio, and G. M. Di San Lio.** 1993. Identification of the phytotoxin mellein in culture fluids of *Phoma tracheiphila*. *Phytochemistry*. 32: 865-867.
- 120. Perry, J. J., Staley J. T., and S. Lory.** 2004. *Microbiologie*. Dunod. France.
- 121. Petroski, R. J., R. B. Bates, G. S. Linz, and J. P. Rosazza.** 1983. Microbial transformation of natural aintitumor agents. XII. Conversion of bouvardin to O-desmethyl-bouvardin and bouvardin catechol. *J. Pharm. Sci.* 72: 1291-1293.
- 122. Pittet, A, and D. Royer.** 2002. Rapid, low cost thin-layer chromatographic screening method for the detection of ochratoxin A in green coffee at a control level of 10 µg/kg. *J. Agric. Food Chem.* 50: 243-247.
- 123. Pohland, A. E., S. Nesheim, L. Friedman.** 1992. Ochratoxin A: a review. *Pure Appl. Chem.* 64: 1029-1046.
- 124. Pohland, A. E.** 1993. Mycotoxins in review. *Food Addit. Contam.* 10: 17-28.
- 125. Proctor, R. H., A. E. Desjardins, and R. D. Plattner.** A polyketide synthase gene required for biosynthesis of fumonisin mycotoxins in *Gibberella fujikuroi* mating population A. *Fungal Genet. and Biol.* 27: 100-112.
- 126. Raper, K. R., D. I. Fennell, and P. K. C. Austwick.** 1965. The genus *Aspergillus*. The Williams & Willkins Company. USA.
- 127. Richard, J. L., R. D. Plattner, J. Mary, and S. L. Liska.** 1999. The occurrence of ochratoxine A in dust collected from a problem household. *Mycopathologia*. 146: 99-103.

- 128. Robbers, J. E, S. Hong, J. Tuite, and W. W. Carlton.** 1978. Production of xanthomegnin and viomellein by species of *Aspergillus* correlated with mycotoxicosis produced in mice. *Appl. Environ. Microbiol.* 36(6): 818-823.
- 129. Rosenbrook, W. J., and R. E. Carney.** 1970. New metabolite from an unidentified *Aspergillus* species. *Tetrahedron Letters.* 22: 1867-1870.
- 130. Sasaki, M., Y. Kaneko, K. Oshita, H. Takamatsu, Y. Asao, and T. Yokotsuka.** 1970. Studies on the compounds produced by moulds. Part VII. Isolation of isocoumarin compounds. *Agric. Biol. Chem.* 34: 1296-1300.
- 131. Saxena, J., C. Munimbazi, and L. B. Bullerman.** 2001. Relationship of mould count, ergosterol and ochratoxin A production. *Inter. J. of Food Microbiol.* 71: 29-34.
- 132. Schimmel, T. G., A. D. Coffman, and S. J. Parsons.** 1998. Effect of butyrolactone on the producing fungus, *Aspergillus terreus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3707-3712.
- 133. Schmidt, H., M. Bannier, R. F. Vogel, and L. Niessen.** 2004. Detection and quantification of *Aspergillus ochraceus* in green coffee by PCR. *Lett. In Appl. Microbiol.* 38(6): 464.
- 134. Schmidt, H., M. Ehrmann, R. F. Vogel, M. H. Taniwaki, and L. Niessen.** 2003. Molecular typing of *Aspergillus ochraceus* and construction of species specific SCAR-primers based on AFLP. *System Appl. Microbiol.* 26: 138-146.
- 135. Schulz, B., J. Sucker, H. J. Aust, K. Krohn, K. Ludewig, P. G. Jones, and D. Doring.** 1995. Biologically active secondary metabolites of endophytic *Pezizula* species. *Mycol. Res.* 99: 1007-1015.

- 136. Sekiguchi, J., S. Katayama, and Y. Yamada.** 1987. 6-Methyl-1,2,4-Benzenetriol, a new intermediate in Penicillic acid biosynthesis in *Penicillium cyclopium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1531-1535.
- 137. Seshime, Y., P. R. Juvvadi, I. Fujii, and K. Kitamoto.** 2005. Discovery of a superfamily of type III polyketide synthase in *Aspergillus oryzae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331: 253-260.
- 138. Shan, R., M. Stadler, H. Anke, and O. Sterner.** 1997. The reactivity of the fungal toxin papyracillic acid. *Tetrahedron.* 53: 6209-6214.
- 139. Shen, B.** 2000. Biosynthesis of Aromatic Polyketides. *Current Chemistry.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 209.
- 140. Shim, W. B. and Woloshuk, C. P. (1999).** Nitrogen repression of fumonisin B1 biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. *FEMS Microbiology Letters* **177**, 109-116.
- 141. Simpson, T. J.** 1986. Studies of polyketide chain-assembly process. *Mycotoxins and phycotoxins.* Steyn and Vleggaar. 85-96.
- 142. Smith, J. E., and M. O. Moss.** 1985. *Mycotoxins: formation, analysis and significance.* John Wiley and Sons, Chichester, United Kingdom.
- 143. Smith, J. E., C. W. Lewis, J. G. Anderson, and G. L. Solomons.** 1994. *Mycotoxins in human nutrition and health.* Science Res. Development. Eu. Commission.
- 144. Solé, M.; Rius, N. and Lorén, J. G. (2000).** Rapid extracellular acidification induced by glucose metabolism in non-proliferating cells of *Serratia marcescens*. *Internatl Microbiol* **3**, 39-43.
- 145. Spizek, J. and Tichy, P. (1995).** Some aspects of overproduction of secondary metabolites. *Floia Microbiol* **40**, 43-50.

- 146. Stack, M. E, and P. B. Mislivec.** 1978. Production of xanthomegnin and viomellein by isolates of *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium cyclopium*, *Penicillium viridicum*. Appl. Environ. Microbiol. 36(4): 552-554.
- 147. Stanforth, S. P.** 1998. Natural product chemistry distance learning unit. (<http://www.unn.ac.uk/~chss1/>)
- 148. Staunton, J., and D. C. Sunter.** 1988. Biosynthesis of canescin, a metabolite of *Aspergillus malignus*. Incorporation of methionine, acetate, succinate, and isocoumarin precursors, labelled with deuterium and carbon-13. J. Chem Soc, Perkin Transactions 1: Org Bio-Org Chem (1972-1999). 4: 747-754.
- 149. Staunton, J., and A. Sutkowski.** 1991. Oxygen-17 NMR in biosynthetic studies: aspyrone, asperlactone and isoasperlactone, metabolites of *Aspergillus melleus*. J. Chem. Soc. Chem. Commun. 16: 1106-1108.
- 150. Staunton, J., and K. J. Weissman.** 2001. Polyketide biosynthesis: a millennium review. Nat. Prod. Rep. 18: 380-416.
- 151. Steyn, P. S., and C. W. Holzapfel.** 1967. The isolation of the methyl and ethyl esters of ochratoxins A and B, metabolites of *Aspergillus ochraceus* Wilh. J. S. Afr. Chem. Inst. 20: 186.
- 152. Strohl, W. R.** 1997. Industrial antibiotics: today and the future. In WR (ed) Bio/technology of antibiotics, 2<sup>nd</sup> edn. Marcel Dekker. New York. 1-47.
- 153. Studer-Rohr, I., D. R. Dietrich, and C. Schlatter.** 1995. The occurrence of ochratoxin A in coffee. Food Chem. Toxicol. 5: 341-355.
- 154. Szakacs, G.; Morovjan, G. and Tengerdy, R. P. (1998).** Production of lovastatin by a wild strain of *Aspergillus terreus*. *Biotechnol Lett* **20**, 411-5.

155. **Sunesen, L. O., and L. H. Stahnke.** 2003. Mould starter cultures for dry sausages-selection, application and effects. *Meat Science*. 65: 935-948.
156. **Takano, Y., Y. Kubo, K. Shimizu, K. Mise, T. Okuno, and I. Furusawa.** 1995. Structural analysis of *PKS1*, a polyketide synthase gene involved in melanin biosynthesis in *Colletotrichum lagenarium*. *Mol. Gen. Genet.* 249: 162-167.
157. **Tang, C. M., J. Cohen, and D.W. Holden.** 1992. An *Aspergillus fumigatus* alkaline protease mutant constructed by gene disruption is deficient in extracellular elastase activity. *Molecular Microbiol.* 6:1663-1671.
158. **Taniwaki, M. H., J. I. Pitt, A. A. Teixeira, and B. T. Iamanaka.** 2003. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. *Inter. J. Food Microbiol.* 82: 173-179.
159. **Torres, M., M. Balcells, N. Sala, V. Sanchis, and R. Canela.** 1998. Bactericidal and fungicidal activity of *Aspergillus ochraceus* metabolites and some derivatives. *Pesticide Science*. 53: 9-14.
160. **Tsai, H. F., Y. C. Chang, R. G. Washburn, M. H. Wheeler, and K. J. Kwon-Chung.** 1998. The developmentally regulated *alb1* gene of *Aspergillus fumigatus*: its role in modulation of conidial morphology and virulence. *J. Bacteriol.* 180: 3031-3038.
161. **Turner, W.B., and D.C. Aldridge.** 1983. *Fungal metabolites II*; Academic Press, Inc.: London, New York.
162. **Umeda, M., T. Tsutsui, and M. Saito.** 1977. Mutagenicity and inducibility of DNA single-strand breaks and chromosome aberrations by various mycotoxins. *Gann.* 68: 619-625.

163. **Van der Merwe, K. J., P. S. Steyn, L. Fourie, B. de Scott, and J. J. Theron.** 1965. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. Nature. 205: 1112-1113.
164. **Varga, J., K. Rigó, S. Kocsubé, B. Farkas, and K. Pál.** 2003. Diversity of polyketide synthase gene sequences in *Aspergillus* species. Res. in Microbiol. S0923-2508.
165. **Varma, S. K., R. A. Verma, and A. K. Jha.** 1991. Ecotoxicological aspects of aspergilli present in the phylloplane of stored leaves of chewing tobacco (*Nicotiana tobaccum*). Mycopathologia. 113(1): 19-23.
166. **Venkatasubbaiah, P., T. B. Sutton, and W. S. Chilton.** 1991. Effect of phytotoxins produced by *Botryosphaeria obtusa*, the cause of black rot of apple fruit and frog-eye leaf spot. Physiol. Biochem. 81: 243-247.
167. **Vrabcheva, T., E. Usleber, R. Dietrich, and E. Martlbauer.** 2000. Co-occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals from Bulgarian villages with a history of Balkan endemic nephropathy. J. of Agric. and Food Chem. 48(6), 2483-2488.
168. **Walton, J. D.** 2000. Horizontal gene transfer and evolution of secondary metabolite clusters in fungi: an hypothesis. Fungal Genet. Biol. 30: 167-171.
169. **Weinberg, E.D. (1978).** Secondary metabolism: regulation by phosphate and trace elements. *Folia Microbiol* **23**, 496-501.
170. **Wolff, J.** 2000. Ochratoxin A in cereals and cereal products. Arch. Lebensmittelhyg. 51: 85-88.
171. **Wolff, J., H. Bresch, C. Cholmakov-Bodechtel, G. Engel, M. Garais, P. Majerus, H. Rosner, and R. Scheuer.** 2000. Ochratoxin A: contamination of foods and consumer exposure. Arch. Lebensmittelhyg. 51: 81-128.

- 172. Yang, G., M. S. Rose, B. G. Turgeon, and O. C. Yoder.** 1996. A polyketide synthase required for fungal virulence and production of the polyketide T-toxin. *Plant Cell*. 8(11): 2139-2150.
- 173. Yu, J. H, and T. J. Leonard.** 1995. Sterigmatocystin biosynthesis in *Aspergillus nidulans* requires a novel type I polyketide synthase. *J. Bacteriol.* 177(16): 4792-4800.
- 174. Yu, J.** 2004. Completed sequence of aflatoxin pathway gene cluster in *Aspergillus parasiticus*. *FEBS Letters*. 564:
- 175. Zamir, L. O.** 1999. The biosynthesis of patulin and oenicillic acid. In Steyn PS, editor. *The biosynthesis of mycotoxins*. New York: Academic Press.
- 176. Zimmermann, J. L., W. W. Carlton, and J. Tuite.** 1979. Mycotoxicosis produced in swine by cultural products of an isolate of *Aspergillus ochraceus*. II. Clinicopathologic changes. *Vet. Pathol.* 16: 702-709.

## Résumé

Le champignon *Aspergillus ochraceus* est connu comme producteur de plusieurs polycétones dont les mycotoxines ochratoxines et acide pénicillique. L'étude de la diversité des gènes de polycétones synthases (PKS) chez *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 a été abordée en utilisant quatre couples d'amorces dégénérées dessinés pour cibler le domaine ketosynthase (3) et le domaine acyltransferase (1). 10 PKS différentes de type I ont été identifiées. Elles sont distribuées dans les trois groupes principaux de PKS : PKS réduite, partiellement réduite et non réduite. Le gène *AoLC35-12* est responsable de la production d'ochratoxine A chez *A. ochraceus*. Le gène *aomsas* de type 6-methylsalicylique synthase intervient dans la biosynthèse d'acide pénicillique, de patuline, d'asperlactone, d'isoasperlactone, de melleine, d'hydroxymelleine et d'ochratoxine A. Ce gène a été totalement séquencé. Deux couples d'amorces spécifiques ont été synthétisés à partir du gène *AoLC35-12*. Avec le couple AoOTAL/AoOTAR, uniquement *A. ochraceus* est détecté par méthode PCR. Avec l'autre couple d'amorces, AoLC35-12L/AoLC35-12R, il est possible de détecter à la fois les producteurs d'ochratoxine A et les producteurs de citrinine. Des amorces spécifiques ont également été développées pour la détection rapide d'*A. carbonarius*, de *P. verrucosum* et de *P. citrinum*.

## Abstract

*Aspergillus ochraceus* is known to produce many polyketides including ochratoxins and penicillic acid. The diversity of polyketide synthase (PKS) genes in *A. ochraceus* NRRL 3174 was investigated by using four degenerate primer pairs targeting ketosynthase domain (3) and acyltransferase domain (1). 10 different type I PKS were identified, and were classed into three main PKS groups: reduced, partially reduced and non reduced. *AoLC35-12* gene was found to be involved in OTA biosynthesis. A PKS gene of 6-methylsalicyclic acid synthase type, *aomsas*, was found to be involved in the biosynthesis of penicillic acid, patulin, asperlactone, isoasperlactone, mellein, hydroxymellein, and ochratoxin A. This gene was completely sequenced. In order to detect ochratoxin A and citrinin producers by using PCR method, two specific primer pairs were generated from *AoLC35-12* gene. AoOTAL/AoOTAR can detect only *A. ochraceus* while AoLC35-12L/AoLC35-12R can detect either ochratoxin A or citrinin producer fungi. Specific primers were also developed to detect *A. carbonarius*, *P. verrucosum* and *P. citrinum*.